



# Reverse T3-RIA

*R-EW-125*



# History

---

## Summary of change:

<b>Previous Version:</b> <b>200724</b>	<b>Current Version:</b> <b>201008</b>
	<p>The following correlation was added:</p> <p><b>6. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING</b></p> <p>Serum or plasma (EDTA and heparin) provides similar results.</p> <p>Y (hep. Li plasma) = 0.95 x (serum) + 0.01 r = 0.95                      n = 20</p> <p>Y (hep. Na plasma) = 0.93 x (serum) + 0.004 r = 0.89                      n = 20</p> <p>Y (EDTA plasma) = 0.88 x (serum) + 0.01 r = 0.97                      n = 20</p>
<p>In the EN, DE and ES versions:</p> <p><b>7. ASSAY PROCEDURE</b></p> <p><b>3. Test procedure</b></p> <p>Centrifuge for:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 20 minutes at 2000 x g;</li></ul>	<p>Correction in the EN, DE and ES versions:</p> <p><b>7. ASSAY PROCEDURE</b></p> <p><b>3. Test procedure</b></p> <p>Centrifuge for:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 25 minutes at 2000 x g;</li></ul>

## FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

### R-EW-125 125 Determinations

#### 1. INTENDED USE

The kit allows the quantitative determination of reverse  $T_3$  by RIA in human serum or plasma.

#### 2. EXPLANATION OF THE TEST

The presence of 3,3',5' triiodothyronine ( $rT_3$ ) in human blood has been demonstrated some years ago (1). Only 3%  $rT_3$ , structurally corresponding to a  $T_4$  molecule without iodine atom in position 5, is synthesized by thyroid gland. The rest is originated from monodeiodination of  $T_4$ , when the last one links peripheral receptors which consist of the enzymes for the production either of  $T_3$  or of  $rT_3$ . The monodeiodination occurs in many organs, but the liver and the kidney are the major sites of conversion. That is why it is possible you can detect anomalous  $rT_3$  levels owing to pathological situations not involving thyroid function (2). Because  $T_3$  is active, while  $rT_3$  is inactive, the production of  $rT_3$  instead of  $T_3$  starting from  $T_4$  can determine several metabolic modifications. In amniotic fluid  $rT_3$  levels are very high; at the birth high TSH levels determines a rapid increase of  $T_3$  and of  $T_4$  even if in small amount, but  $rT_3$  levels are unchanged for some days. This situation can be due to the small intrathyroidal storage of  $rT_3$ . For the same reason the administration of exogenous TSH does not increase  $rT_3$  levels in normal adults (3). It is very interesting to underline that in several conditions associated with low  $T_3$  values, high  $rT_3$  concentration are detectable (4). Some systemic illnesses such as hepatic cirrhosis and protein malnutrition are named «low- $T_3$  syndrome» (5). These pathologies are associated to low  $T_3$  levels, with concomitant high  $rT_3$  levels. Moreover Chopra demonstrated the same situation in newborn sera (2). This physiological  $rT_3$  increase brings back to normal only within 8-10th days of life, while all thyroidal parameters brings back to normal within the first week of life (6).  $RT_3$  profile during pregnancy has been used to reveal gestational age and fetal well-being, even if clear correlations are still unknown.

#### 3. PRINCIPLES OF THE METHOD

The kit has been designed for quantitative determination, by RIA, of reverse  $T_3$  in serum or plasma, without any preliminary treatment of the samples.

Antigen, whether from standards or from samples competes with radioactive tracer ( $^{125}I$ - $RT_3$ ) for the binding sites of antibody. After incubation, the amount of tracer bound to antibody will be inversely proportional to the amount of antigen present in standards or in samples. B/F separation is performed by addition of polyethylene glycol and the immunocomplex is collected by centrifugation.

The main steps of assay are:

- Incubation of reaction mixture for 3 hours at room temperature (18-25°C).
- Precipitation of immunocomplex by polyethyleneglycol.
- Centrifugation and decantation or aspiration.
- Counting of radioactivity.

#### 4. REAGENTS

**Do not interchange reagent from different kit lots. Lot numbers of reagent should be as stated on the "Certificate of Analysis". Do not use kit component beyond their expiration date.**

The Reverse kit contains sufficient reagents for 125 tubes. On receipt, store the kit at 2-8°C, until the expiration date printed on the label.

Reagents	125 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
<b>ANTISERUM</b> Antiserum: Raised in rabbit, in Tris buffer with bovine serum albumin and sodium azide, <0.1% w/w	1 Vial Lyophilized		<b>Add 12.5 ml distilled water</b>

<b>Ag</b> <sup>125I</sup> TRACER : contains $RT_3$ labelled with $^{125}I$ in Tris buffer with Sodium Azide, <0.1%	1 Vial 13ml 75 kBq	Red	<b>Ready to Use</b>
<b>CAL 0</b> Calibrator zero in phosphate buffer with bovine serum albumin and sodium azide, 0.05% w/w	1 Vial Lyophilized	Yellow	<b>Add 2 mL distilled water</b>
<b>CAL N</b> Calibrator - N = 7 in phosphate buffer with bovine serum albumin and sodium azide, 0.05% w/w	7 Vials Lyophilized	Yellow	<b>Add 1 mL distilled water</b>
<b>CONTROL N</b> Control - N = 1 Contains human serum, sodium azide	1 Vial Lyophilized	Silver	<b>Add 1 mL distilled water</b>
<b>PEG SOLN</b> PEG Solution : contains polyethyleneglycol 20% in phosphate buffer with Tween 20, 0.1% and sodium azide, <0.1% w/w.	2 Vials 62.5ml		<b>Ready to Use</b>

1.  **$RT_3$  Antiserum:** Store at 2-8°C. Reconstitute the contents of the vial with 12.5 ml distilled water and mix gently until the complete solubilization of freeze-dried residue. After reconstitution store at 4°C for 3 days or at -20°C for longer length of time until expiration of the vial label.
2.  **$RT_3$  Calibrators:** Expiry date is stated on the vial labels. Store at 2-8°C. Reconstitute the contents of calibrator zero with 2 ml distilled water and the remaining calibrators with 1 ml distilled water. Mix gently until the complete solubilization of freeze-dried residue. After reconstitution store at 4°C for 3 days or at -20°C for longer length of time until expiration of the vial label. The value of each calibrator vary from batch to batch. **For the exact value, refer to the vial label.**
3.  **$^{125}I$ -Reverse  $T_3$  :** Store at 2-8°C until expiration date printed on the vial label. The reagent is ready to use, allow the reagent to reach temperature (18-25°C) and mix thoroughly by gentle inversion avoiding foam before use.
4. **20% TW PEG Solution:** Store at 2-8°C until the expiration date on the vial label. Do not freeze.
5. **Control:** Store at 2-8°C. The expiry date is reported on vial label. Reconstitute the contents of the vial with 1 ml distilled water and mix gently until the complete solubilization of freeze-dried residue. Store at 2-8°C for 1-2 days or at -20°C for longer length of time.

#### Indications of Reagents Deterioration

1. Moisture in any of the lyophilized reagents.
2. Precipitation in any of the reconstituted reagents except the PEG Solution.

#### 5. WARNING AND PRECAUTIONS FOR USERS

**For *in vitro* diagnostic use.**

**Only experienced laboratory personnel should use this test and handling should be in agreement with GLP.**

**Radioactive Material - Not for Internal or External Use in Humans or Animals.**

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation there from to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations of each country.

Physical characteristics of  $^{125}I$ : see end of instructions

- Safety Precautions:** The following precautions should be observed in handling radioactive material:
  - Store radioactive materials in a designated area.
  - Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where radioactive materials are being handled.
  - Do not pipette by mouth.
  - Wear gloves when handling radioactive materials and wash hands thoroughly afterwards.
  - Cover working area with disposable absorbent paper.
  - Wipe up all spills immediately and thoroughly and dispose of the contaminated materials as radioactive waste.
  - Dispose of the liquid radioactive waste into the sanitary sewage system if permitted by the local regulations.

- CHEMICAL HAZARD Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) Warning:** Some of the reagents in this kit contain sodium azide as a preservative. For all such reagents, the concentration of sodium azide is <0.1% p/p. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Dispose of all non radioactive reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

**H370 very toxic if swallowed.**  
**EUH031 contact with acids liberates very toxic gas.**

- POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL Warning:** This kit may contain some reagents made with human serum or plasma. The serum or plasma used has been tested by an FDA-approved method and found to be non-reactive for HIV-1/2 Antibodies, HCV and HBsAg. Because no method can offer complete assurance that HIV-1/2, HCV, HBsAg or other infectious agents are absent, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 3<sup>rd</sup> Edition 1993.

## 6. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Serum or plasma samples can be used.

**Plasma:** add an anticoagulant, centrifuge for 10 minutes and collect the plasma.

**Serum:** allow the blood to clot at room temperature (18-25°C). Centrifuge for 10 minutes and collect the serum.

**Storage:** if the assay is performed within 24 hours from collection, store at 4°C; for longer storage, store at -20°C, avoiding to thaw the sample more than once; if necessary aliquot. If after thawing the sample is turbid, we suggest to centrifuge it before the assay. Grossly lipemic or badly hemolyzed samples must not be used.

**Dilutions:** the samples can be assayed undiluted. Eventual dilutions must be performed using calibrator zero supplied with the kit.

Serum or plasma (EDTA and heparin) provides similar results.

$$Y (\text{hep. Li plasma}) = 0.95 \times (\text{serum}) + 0.01 \quad r = 0.95 \quad n = 20$$

$$Y (\text{hep. Na plasma}) = 0.93 \times (\text{serum}) + 0.004 \quad r = 0.89 \quad n = 20$$

$$Y (\text{EDTA plasma}) = 0.88 \times (\text{serum}) + 0.01 \quad r = 0.97 \quad n = 20$$

## 7. ASSAY PROCEDURE

### 1. Materials Provided

The Reverse T<sub>3</sub> kit is sufficient for 125 tubes and contains the following reagents:

Reagent	Number
Reverse T <sub>3</sub> Antiserum	1
Reverse T <sub>3</sub> Calibrators	8
<sup>125</sup> I Reverse T <sub>3</sub>	1
20% Tween Peg Solution	2
Control	1

### 2. Equipment required but not supplied with the kit

- Distilled water.
- Plastic test tubes (about 1 x 7 cm).
- Graduates pipettes.
- Automatic micropipettes with disposable tips (0.1 ml).

- Vortex mixer.
- Gamma-Counter.
- Multi-sample centrifuge
- Automatic dispenser for addition of PEG.

### 3. Test procedure

Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) and mix gently before the use.

- For each assay prepare 5 groups of tubes:
    - 2 tubes for total radioactivity.
    - 2 tubes for NSB (non specific binding).
    - 2 tubes for B0 ("0" concentration of cold antigen).
    - 2 tubes for each calibrator.
    - 2 tubes for each sample and Control.
  - Pipette into the respective tube 0.1 ml of sample, calibrator and Control .
  - Pipette into B0 and NSB respectively 0.1 and 0.2 ml of calibrator zero.
  - Add into all tubes 0.1 ml of <sup>125</sup>I-RT<sub>3</sub>.
  - Add into all tubes except NSB and Total Radioactivity tubes 0.1 ml of RT<sub>3</sub> Antiserum.
  - Mix and incubate for 3 hours at room temperature (18-25°C).
  - Add into all tubes except into total radioactivity tubes 1.0 ml of 20% TW PEG Solution.
  - Mix on vortex and centrifuge all tubes except total Radioactivity tubes.
- Centrifuge for:
- 25 minutes at 2000 x g;
  - 20 minutes at 2500 x g;
  - 15 minutes at 3500 x g;
- $$g = 1.1178 \times 10^{-5} \times r \times n^2; \quad (g=\text{gravity}; n = \text{number of turns/minute}; r = \text{radius in cm}).$$
- Eliminate carefully the supernatant by decantation or aspiration (except total radioactivity).
  - Count in Gamma-Counter for at least 1 minute.

### 4. Assay Procedure Scheme

The volumes are expressed in ml

Reagents	Tubes	Sample	B0	Calibrator	NSB	Total Radioactivity
Samples or Serotest	0.1	-	-	-	-	-
Calibrator zero	-	0.1	-	-	0.2	-
Calibrators	-	-	-	0.1	-	-
<sup>125</sup> I-RT <sub>3</sub>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RT <sub>3</sub> Antiserum	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
Mix and incubate for 3 hours at room temperature (18-25°C).						
20% TW PEG Solution		1.0	1.0	1.0	1.0	-
Mix on vortex and centrifuge. Aspirate or decant (except from total radioactivity). Count all tubes in Gamma-Counter for at least 1 minute.						

## 8. RESULTS

NSB mean counts may be subtracted from all mean counts except from total radioactivity. B0 mean counts are used to calculate the % binding in absence of cold antigen (maximum binding).

$$\frac{\text{B0 mean counts}}{\text{Total radioactivity mean counts}} \times 100 = \% \text{ binding}$$

% relative binding of calibrator and samples is calculated with the following formula:

$$\frac{\text{Mean counts (calibrator, sample or Serotest)}}{\text{B0 mean counts}} \times 100 = \% \text{ relative binding}$$

Draw the dose-response curve by plotting the % relative binding of each calibrator (y axis) against the relative concentration (x axis) using semilogarithmic paper.

By interpolating on the standard curve the % relative binding of each sample, one obtains the sample antigen concentration in ng/ml. For diluted samples it is necessary to multiply the value read on standard curve by dilution factor.

For data computerization we suggest to refer to bibliography (8,9). The user can choose, according to assay characteristic, the calculation method and the graphic expression which allows the best data treatment.

### 1. Example of calculation - Representative Standard Curve

Tubes	Mean cpm	B/T (%)	B/B0 (%)	Concentrations (ng/ml)
Total Radioactivity	19649,1	-	-	-
NSB	652,5	3,32	-	-
B0	7869,2	36,73	-	-
C.1 0.02 ng/ml	7322,0	-	92,42	-
C.2 0.06 ng/ml	6499,8	-	81,02	-
C.3 0.12 ng/ml	5354,3	-	65,15	-
C.4 0.33 ng/ml	4059,3	-	47,21	-
C.5 0.65 ng/ml	2941,4	-	31,72	-
C.6 1.15 ng/ml	2302,8	-	22,87	-
C.7 2.14 ng/ml	1703,4	-	14,56	-
Control	3141,6	-	33,40	0.57

Do not use this example instead of data obtained during the assay. For the exact value, refer to the vial label.

### INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

### 9. LIMITATIONS

1. To obtain reliable results it is necessary to follow carefully the instruction reported in this package insert.
2. Do not use the reagents beyond the expiry date stated on vial labels.
3. Do not mix reagents from different lots.
4. After reconstitution, store the reagents at 4°C for 3 days in the stoppered vials. After reconstitution and storage at 4°C, the reagents can be used only once. For longer than 3 days storage, freeze the reagents at -20°C. After freezing, allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) gradually, avoiding to use water-bath at 37°C. Avoid to thaw the reagents more than once.
5. Samples contaminated with radioactivity may give inaccurate results.

### 10 EXPECTED VALUES

	Concentration (ng/ml)
Normal men and women : 77 samples	0.17-0.44

We suggest that each laboratory establishes its own normal range. Conversion into international units or nmol/l: nmol/l = ng/ml • 1.54.

### 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### 1. Accuracy

Recovery studies were performed by adding rT<sub>3</sub> serum or plasma samples. RT<sub>3</sub> values were determined before and after addition, and the % recovery of added rT<sub>3</sub> calculated.

Sample	rT <sub>3</sub> added (ng/ml)	rT <sub>3</sub> measured (ng/ml)	% Recovery
1	0.83	0.70	84.4
	0.36	0.34	95.1
	0.13	0.11	81.1
	0.06	0.06	94.0
	0.02	0.02	107.9
2	0.96	0.81	85.1
	0.52	0.47	90.0
	0.15	0.14	91.5
	0.07	0.06	80.1

#### 2. Dilution

In a dilution study plasma samples were diluted with calibrator zero and the recovery determined.

Sample	Dilution factor	rT <sub>3</sub> measured (ng/ml)	% Recovery
1	1	1.79	100.0
	2	0.94	95.3
	4	0.44	102.1
	8	0.21	106.1
2	1	1.65	100.0
	2	0.48	97.4
	4	0.25	93.7
	8	0.12	100.4

#### 3. Precision

Intra-Assay coefficient of variation was evaluated using three samples measured 12 times in the same assay. The within assay variability is shown below:

Sample	Mean ng/ml	Standard Deviation ng/ml	C. V. %
A	0.67	0.03	4.1
B	0.26	0.01	4.0
C	0.10	0.01	9.7

Inter-Assay coefficient of variation (C.V.) was evaluated using three samples run in 10 different assays. The between assay variability is shown below:

Sample	Mean ng/ml	Standard Deviation ng/ml	C. V. %
A	0.62	0.04	5.7
B	0.28	0.02	7.4
C	0.14	0.01	10.5

#### 4. Sensitivity

The LoB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank 20 times and was calculated as the mean + 2 Standard Deviations of the distribution of the test values ; the calculated LoB is 0.014 ng/ml.

The LoD (Limit of Detection) was calculated as the LoB + 1.645 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different run .The calculated LoD is 0.025 ng/ml.

The LoQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 5 low values samples, 9 times. The calculated LoQ is 0.035 ng/ml.

#### 5. Specificity

The specificity has been evaluated by the interference of the following compounds, similar to rT<sub>3</sub> % of interference has been calculated according to Abraham's method (x/y • 100) where x and y are respectively the weight of rT<sub>3</sub> and of interfering compound which causes a decrease of 50% in the binding capacity:

Compound	% Cross-Reactivity
Reverse T <sub>3</sub>	100
L-Thyroxine (T <sub>4</sub> )	0.22
3,5,3'- Triiodothyronine (T <sub>3</sub> )	0.024
3,3'- Diiodo-L-Thyronine	15
3,5- Diiodo-L-Thyronine	0.0002
3,5,3'- Triiodothyroacetic Acid (Triac)	0.023
3- Monoiodothyrosine (MIT)	0.0001
3,5- Diiodothyrosine (DIT)	0.0048
Acetylsalicylic Acid	<0.0001
Phenylbutazone	<0.0001

The potentially interfering effects of hemoglobin at 500 mg/dl, of bilirubin at 100 mg/dl and of triglycerides at 250 mg/dl have been evaluated. The results of this test do not demonstrate any significant interference as shown in the table below.

<b>Interfering substance</b>	<b>Serum sample (ng/ml)</b>	<b>Plasma sample (ng/ml)</b>
-	0.53	0.18
Haemoglobin	0.55	0.18
Bilirubin	0.53	0.15
-	0.58	0.15
Triglycerides	0.51	0.17

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

201008

## UNIQUEMENT POUR UTILISATION IN VITRO

R-EW-125 125 Déterminations

## 1. UTILISATION DU PRODUIT

Le kit permet de déterminer le dosage de reverse  $T_3$  à l'aide d'une technique radio-immunologique dans des échantillons de sérum ou de plasma.

## 2. APPLICATIONS DU DOSAGE

La présence de tri-iodo 3,3',5' thyronine ( $T_3$  reverse ou  $Rt_3$ ) dans le sang est prouvée depuis plusieurs années déjà (1). La  $rT_3$  qui correspond du point de vue structurel à une molécule de  $T_4$  sans un atome d'iode en position 5, dans l'anneau de la tyrosine provient pour 3% de la thyroïde et pour 97% de la monodéiodation de la  $T_4$ , au moment où celle-ci se lie au récepteur périphérique qui serait donc doté d'enzymes servant à la production de  $T_3$  et de  $rT_3$ . La monodéiodation aurait lieu dans différents organes, mais elle prévaut surtout dans le foie et le rein. C'est la raison pour laquelle il est possible de relever le taux de  $rT_3$  en circulation (2) dans différentes situations pathologiques qui ne sont pas directement liées à la fonctionnalité thyroïdienne. La  $T_3$  étant active du point de vue métabolique, tandis que la  $rT_3$  ne l'est pas, la modification éventuelle du processus de déiodation périphérique de la  $T_4$  de la formation de la  $T_3$  à celle de la  $T_3$  reverse peut provoquer de considérables modifications métaboliques. Le taux de  $rT_3$  est par contre particulièrement élevé dans le liquide amniotique. A la naissance, l'augmentation de TSH provoque une augmentation rapide de  $T_3$  et de  $T_4$ , bien qu'en proportion inférieure. Elle n'influence toutefois pas le taux de  $rT_3$  qui reste inchangé pendant quelques jours. Cela s'expliquerait par une faible disponibilité intra-thyroïdienne de  $rT_3$ . Cet aspect expliquerait en outre le fait qu'aucune hausse de  $rT_3$  n'est relevée suite à l'administration de TSH exogène chez l'adulte normal (3). Il est intéressant de noter que les concentrations de  $rT_3$  sont élevées dans de nombreuses conditions dans lesquelles le taux sérique de  $T_3$  est inférieur à la normale (4). Cette variation réciproque des deux hormones a été trouvée dans certaines maladies systémiques, comme la cirrhose du foie, et dans un groupe de patients soumis à un régime très pauvre en protéines. Ces situations sont en général définies «Low  $T_3$  Syndrome» (5). Chopra a en outre démontré un taux élevé de  $rT_3$  et faible de  $T_3$  dans le sérum humain du nouveau-né (2). Cette élévation physiologique de  $rT_3$  se normalise seulement entre le 8<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après la naissance, tandis que tous les autres paramètres thyroïdiens se stabilisent au cours de la première semaine de vie (6). Le comportement du taux de  $rT_3$  durant la grossesse a été utilisé pour obtenir des informations concernant l'âge de gestation et la vie fœtale, bien qu'aucune corrélation précise n'ait encore été trouvée.

## 3. PRINCIPE DE LA METHODE

Le kit permet de déterminer la quantité de  $T_3$  reverse à l'aide d'une technique radio-immunologique dans des échantillons de sérum ou de plasma, sans aucun traitement préliminaire de l'échantillon. L'antigène présent dans les étalons et dans les échantillons est relevé par le traceur radioactif ( $^{125}\text{-RT}_3$ ) pour les zones liées de l'anticorps. Après l'incubation, la quantité de traceur qui se lie à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans les étalons et les échantillons. La séparation B/F est effectuée par l'adjonction de polyéthylène glycol et le précipité est recueilli par centrifugation.

Les phases principales du dosage sont :

- Incubation du mélange de réaction pendant 3 heures à température ambiante (18-25°C).
- Précipitation de l'immuno-complexe par adjonction de polyéthylène glycol.
- Centrifugation et décantation ou aspiration.
- Comptage de la radioactivité.

## 4. REACTIFS - PREPARATION ET CONSERVATION

Ne pas utiliser de réactifs d'autres lots. Les numéros de lots des réactifs doivent correspondre à ceux qui sont déclarés sur le «Certificat d'analyse». Ne pas utiliser le kit lorsque la date de péremption est dépassée.

Il kit Reverse  $T_3$  contient les réactifs suffisants pour 125 tubes. A réception du kit, le conserver à une température comprise entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Réactifs	125 Tests	Code couleur	Reconstitution
<b>ANTISERUM</b> Antisérum: contient de l'antisérum anti-RT3 obtenu chez un lapin dans un tampon Tris avec de l'albumine bovine sérique et du nitrate de sodium < 0,1 % p/p	1 flacon Lyophilisé		12.5 ml d'eau distillée
<b>Ag</b> <sup>125I</sup> TRACEUR : contient du RT3 marqué par du <sup>125I</sup> dans un tampon Tris avec du nitrate de sodium 0,1%.	1 flacon 13ml 75 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
<b>CAL0</b> Calibrateur 0 tampon phosphaté avec de l'albumine bovine sérique et du nitrate de sodium, 0,05% p/p	1 flacon Lyophilisé	Jaune	2 ml d'eau distillée
<b>CALN</b> Calibrateurs - N = 7 tampon phosphaté avec de l'albumine bovine sérique et du nitrate de sodium, 0,05% p/p	7 flacons Lyophilisés	Jaune	1 ml d'eau distillée
<b>CONTROLN</b> Contrôle - N = 1 Contient du sérum humain lyophilisé avec du nitrate de sodium	1 flacon Lyophilisé	Argent	1 ml d'eau distillée
<b>PEG</b> <b>SOLN</b> PEG Solution : contient du polyéthylène glycol MW 6000 dans une solution de tween 20 et de nitrate de sodium	2 flacons 62.5ml		Prêt à l'emploi

- RT<sub>3</sub> Antisérum** : La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. Conserver à 2-8°C. Reconstituer le contenu du flacon avec 12,5 ml d'eau distillée et mélanger délicatement, jusqu'à complète solubilisation du lyophilisé. Après reconstitution, conserver à 4°C pendant 3 jours ou à -20°C pour une période plus longue, jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.
- RT<sub>3</sub> Calibrateurs**: La date de péremption est indiquée sur l'étiquette des flacons. Conserver à 2-8°C. Reconstituer le contenu du flacon calibrateur 0 avec 2 ml d'eau distillée et les étalons restant avec 1 ml d'eau distillée. Mélanger délicatement jusqu'à complète solubilisation du lyophilisé. Après reconstitution, conserver à 4°C pendant 3 jours ou à -20°C pour une période plus longue, jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon. La valeur de chaque calibrateur varie d'un lot à l'autre. **Pour la valeur exacte, reportez-vous à l'étiquette du flacon.**
- <sup>125I</sup> RT<sub>3</sub>** : La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. Conserver à 2-8°C. Le réactif est prêt à l'emploi. Avant de l'utiliser, agiter délicatement par inversion en évitant la formation de mousse. S'assurer que la température de la solution est ~18-



25°C. Conserver à 2-8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

- Solution 20% TW PEG:** Conserver à 2-8°C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. Le contenu du flacon est prêt à l'emploi. Conserver à 2-8°C. Ne pas congeler.
- Sérum de contrôle :** Contient du sérum humain lyophilisé avec du nitrate de sodium. Conserver à 2-8°C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. Reconstituer le contenu du flacon avec 1,0 ml d'eau distillée et mélanger délicatement jusqu'à complète solubilisation du lyophilisé en évitant la formation de mousse. Conserver à 2-8°C pendant 1 à 2 jours, à -20°C pour les périodes plus longues.
- Indications sur la détérioration des réactifs:**
  - Présence d'humidité dans les sérums de contrôle lyophilisés.
  - Présence d'un précipité dans les réactifs reconstitués.

## 5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Ce matériel doit exclusivement être utilisé à des fins de diagnostic *in vitro*.

Le kit est réservé à une utilisation professionnelle. Il doit donc être utilisé exclusivement par du personnel de laboratoire expert, conformément aux normes GLP.

Caractéristiques physique de <sup>125</sup>I: voir fin de la notice

### 1. Précautions: Matériel radioactif - Ne pas administrer par voie interne ou externe à des êtres humains ou à des animaux.

Le matériel radioactif ne peut être acheté, commandé et détenu que par du personnel médical, des laboratoires d'analyse, des hôpitaux et uniquement à des fins de diagnostic IN VITRO. Il ne doit en aucun cas être administré par voie interne ou externe à des être humains ou des animaux. La réception, l'achat, la possession, l'utilisation et le transfert de ce matériel sont soumis à des réglementations qui peuvent être différentes dans chaque pays.

Mesures de précaution pour l'utilisation de matériel radioactif :

- Conservé le matériel radioactif dans un endroit prévu à cet effet.
  - Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de cosmétiques dans les zones destinées à l'utilisation de matériaux radioactifs.
  - Ne pas pipeter la solution radioactive avec la bouche.
  - Porter des gants pour manipuler du matériel radioactif et se laver soigneusement les mains après son utilisation.
  - Couvrir la zone de travail à l'aide de papier absorbant jetable.
  - Toute perte accidentelle de produit radioactif doit être traitée selon les procédures établies.
  - Tous les matériaux radioactifs doivent être éliminés selon des systèmes d'élimination conformes aux dispositions prévues par les organismes de contrôle ayant juridiction sur le laboratoire.
- Risque biologique - Sérum humain:** Le kit contient des réactifs préparés à l'aide de sérum ou de plasma humain. Le sérum et le plasma employés ont été testés selon une méthode approuvée par la FDA. Ils sont négatifs à la présence d'anticorps HIV-1/2, HCV et HbsAg. Toutefois, aucune méthode ne permet d'établir avec certitude que le HIV-1/2, HCV, HbsAg ou d'autres agents infectieux sont absents. Ces réactifs devraient donc être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec les précautions appliquées pour les échantillons de sérum ou de plasma au Biosafety Level 2 et selon les dispositions du manuel sanitaire CDC (Centers for Disease Control/National Institutes of Health), «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 3<sup>ème</sup> Edition, 1993.
  - Risque chimique - Nitrate de sodium (NaN<sub>3</sub>):** Le nitrate de sodium est utilisé dans les réactifs du kit à une concentration finale ne dépassant pas 0,1%. Le nitrate de sodium peut réagir avec les tuyaux d'évacuation en plomb et cuivre en formant des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination du produit, rincer abondamment à l'eau pour éviter l'accumulation d'azides.

H370 très toxique en cas d'ingestion.  
EUH031 le contact avec des acides libère des gaz très toxiques.

## 6. COLLECTE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Des échantillons de sérum ou de plasma peuvent être utilisés.

**Plasma :** ajouter un anti-coagulant au prélèvement. Centrifuger pendant 10 minutes et recueillir le plasma.

**Sérum :** laisser le prélèvement à température ambiante (18-25°C) pour permettre la formation du caillot et le retirer. Centrifuger 10 minutes et recueillir le sérum.

**Conservation :** si le dosage est effectué 24 heures après le prélèvement, conserver à 4°C. Pour une conservation plus longue, conserver à -20°C. Eviter de décongeler l'échantillon à plusieurs reprises. Fractionner au besoin. Si après la décongélation l'échantillon est trouble, il est conseillé de le centrifuger avant le dosage. Les échantillons fortement lipémiques et hémolysés doivent être éliminés.

**Dilutions :** les échantillons doivent être dosés non dilués. Les éventuelles dilutions peuvent être effectuées à l'aide du calibrateur 0 fourni dans le kit.

Le sérum ou le plasma (EDTA et héparine) donne des résultats similaires.

Y (plasma hép. Li) = 0,95 x (sérum) + 0,01 r = 0,95 n = 20

Y (plasma hép. Na) = 0,93 x (sérum) + 0,004 r = 0,89 n = 20

Y (plasma EDTA) = 0,88 x (sérum) + 0,01 r = 0,97 n = 20

## 7. PROCEDURE

### 1. Matériel fourni

Le kit Reverse T<sub>3</sub> est prévu pour 125 tubes; il contient les réactifs suivants:

Réactifs	Quantité
RT <sub>3</sub> Antisérum	1
RT <sub>3</sub> Calibrateurs	8
<sup>125</sup> I RT <sub>3</sub>	1
Solution 20% Tween Peg	2
Sérum de contrôle	1

### 2. Matériel nécessaire non fourni dans le kit

- Eau distillée.
- Tubes à essais en plastique (environ 1 x 7 cm).
- Pipettes automatiques à pointes interchangeables de 0,1 ml.
- Dispensateur répétitif pour ajouter le PEG.
- Vortex.
- Pipettes graduées.
- Centrifugeuse multi-échantillons à bras oscillants.
- Compteur de rayons gamma.

### 3. Description du dosage

- Porter les réactifs à température ambiante (18-25°C) et les mélanger avant l'emploi.
- Préparer 5 groupes d'éprouvettes pour chaque dosage:
  - 2 éprouvettes pour la radioactivité totale ;
  - 2 éprouvettes pour « NSB » (contrôle des cpm non spécifiques);
  - 2 éprouvettes pour chaque «B0» (concentration «0» d'hormone froide) ;
  - 2 éprouvettes pour chaque calibrateur ;
  - 2 éprouvettes pour chaque échantillon et Sérotest.
- Pipeter dans les différentes éprouvettes de dosage 0,1ml des doser, des étalons et des Sérotests. Dans les éprouvettes définies avec B0 et NSB pipeter respectivement 0,1 et 0,2 ml d'étalon 0.
- Additionner à toutes les éprouvettes 0,1 ml de <sup>125</sup>I-RT<sub>3</sub>.
- Additionner à toutes les éprouvettes, à l'exception de NSB et radioactivité totale, 0,1 ml de RT<sub>3</sub> Antisérum.
- Mélanger et incubé pendant 3 heures à température ambiante (18-25°C).
- Additionner à toutes les éprouvettes, à l'exception de la radioactivité totale, 1,0 ml de 20% TW PEG Solution.
- Mélanger le contenu des éprouvettes à l'aide du Vortex.
- Centrifuger toutes les éprouvettes, à l'exception de la radioactivité totale.

Pour la centrifugation, nous conseillons de suivre l'une des trois combinaisons suivantes:

- 25 minutes à 2000 x g;
- 20 minutes à 2500 x g;
- 15 minutes à 3500 x g;

$g = 1,1178 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$ ; (g= gravité; r = rayon en cm; n = nombre de tours/minute).

- Soigneusement éliminer le surnageant par décantation ou par aspiration.
- Compter toutes les éprouvettes dans le compteur à rayons gamma pendant au moins 1 minute.

3. **Schéma du procédé de dosage** (les volumes sont exprimés en ml)

Tubes Réactifs	Échantil.	Bo	Calib.	NSB	Radioactivité Total
Echantil.ou Sérotest	0,1	-	-	-	-
Calibrateur zéro	-	0,1	-	0,2	-
Calibrateurs	-	-	0,1	-	-
$^{125}\text{I-RT}_3$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
RT <sub>3</sub> Antisérum	0,1	0,1	0,1	-	-
Mélanger et incuber pendant 3 heures à température ambiante (18-25°C).					
20% TW PEG Solution	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Mélanger sur le vortex et centrifuger. Aspirer ou décanter (à l'exception de la radioactivité totale). Compter toutes les éprouvettes dans le compteur à rayons gamma pendant au moins 1 minute.					

### 8. CALCUL DES RÉSULTATS

Nous suggérons de soustraire la moyenne des cpm de NSB à tous les comptes, sauf à la radioactivité totale. La moyenne des cpm liés dans les B0 est utilisée pour calculer le pourcentage de liaison en l'absence d'antigène froid (liaison maximum).

$$\frac{\text{Moyenne des cpm liés dans les B0}}{\text{Moyenne des cpm de Radioactivité totale}} \times 100 = \% \text{ de liaison}$$

Calculer le pourcentage de liaison de chaque étalon, échantillon et Sérotest selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Moyenne des cpm liés (calibrateurs, échantillons et Sérotests)}}{\text{Moyenne des cpm liés dans les B0}} \times 100 = \% \text{ d'inhibition}$$

Tracer la courbe dose-réponse sur du papier semi-logarithmique. Reporter le pourcentage d'inhibition obtenu pour chaque dose de calibrateur, contre les différentes concentrations de calibrateur ; reporter en abscisse les doses standards et en ordonnée le pourcentage d'inhibition.

En interpolant sur la courbe les pourcentages d'inhibition, on obtient les concentrations correspondantes d'hormones en ng/ml. Pour les échantillons dilués, multiplier la valeur qui apparaît sur la courbe par le facteur de dilution.

Pour les méthodes de calcul par ordinateur, il est conseillé de consulter la bibliographie (8, 9). D'après les caractéristiques des dosages, l'utilisateur pourra choisir la méthode de calcul et l'expression graphique permettant d'obtenir le traitement des résultats le plus approprié.

1. **Exemple de calcul - Courbe typique standard**

Description	Moyenne cpm	B/T (%)	B/B0 (%)	Dose (ng/ml)
Radioactivité totale	19649,1	-	-	-
NSB	652,5	3,32	-	-
B0	7869,2	36,73	-	-
C 1 0,02 ng/ml	7322,0	-	92,42	-
C 2 0,06 ng/ml	6499,8	-	81,02	-
C 3 0,12 ng/ml	5354,3	-	65,15	-
C 4 0,33 ng/ml	4059,3	-	47,21	-
C 5 0,65 ng/ml	2941,4	-	31,72	-
C 6 1,15 ng/ml	2302,8	-	22,87	-
C 7 2,14 ng/ml	1703,4	-	14,56	-
Contrôle	3141,6	-	33,40	0,57

Les données ne doivent en aucun cas être utilisées pour remplacer les données obtenues par l'utilisateur. Pour la valeur exacte, reportez-vous à l'étiquette du flacon.

### CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le contrôle n'est pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

### 9. LIMITES DU DOSAGE

1. Pour un bon dosage, il est nécessaire de se tenir strictement aux instructions fournies ici.
2. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption reportée sur l'étiquette des flacons.
3. Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
4. Après la reconstitution et la conservation à 4°C, les réactifs doivent être utilisés une seule fois. Pour les périodes de plus de trois jours, congeler les réactifs à -20°C. Après la congélation, laisser les réactifs atteindre graduellement la température ambiante (18-25°C), en évitant l'utilisation de bain-marie à 37°C. Eviter de décongeler les réactifs plus d'une fois. Fractionner au besoin.
5. Les échantillons contaminés par la radioactivité peuvent fournir des résultats peu précis.

### 10. INTERPRETATION DES RÉSULTATS

Sérum de:	Concentration (ng/ml)
Hommes et femmes normaux : 77 échantillons	0,17-0,44

Il est recommandé à chaque laboratoire de déterminer sa plage de normalité.

Conversion en unités internationales ou en nmol/l:  
nmol/l = ng/ml • 1,54.

### 11. PERFORMANCE

#### 1. Précision

Le test de récupération a été effectué en additionnant des quantités connues de rT<sub>3</sub> à un ensemble d'échantillons de sérum ou plasma. Le taux de rT<sub>3</sub> a été déterminé avant et après l'addition. Le pourcentage de récupération de rT<sub>3</sub> ajouté a été calculé.

Échantillon	rT <sub>3</sub> ajouté (ng/ml)	rT <sub>3</sub> mesuré (ng/ml)	% de récupération
1	0,83	0,70	84,4
	0,36	0,34	95,1
	0,13	0,11	81,1
	0,06	0,06	94,0
	0,02	0,02	107,9
2	0,96	0,81	85,1
	0,52	0,47	90,0
	0,15	0,14	91,5
	0,07	0,06	80,1

#### 2. Dilution

Dans une étude de dilution, des échantillons de plasma à des concentrations élevées de rT<sub>3</sub> ont été dilués avec le calibrateur zéro et le pourcentage de récupération a été déterminé.

Échantillon	Facteur de dilution	rT <sub>3</sub> mesuré (ng/ml)	% de récupération
1	1	1,79	100,0
	2	0,94	95,3
	4	0,44	102,1
	8	0,21	106,1
2	1	1,65	100,0
	2	0,48	97,4
	4	0,25	93,7
	8	0,12	100,4

#### 3. Précision

Le coefficient de variation intra-essai a été évalué à partir de 3 échantillons de différentes concentrations testés 12 fois dans le même dosage. La variabilité intra-essai est indiquée dans le tableau suivant :

Échantillon	Moyenne ng/ml	Déviat Standard ng/ml	C. V. %
A	0,67	0,03	4,1
B	0,26	0,01	4,0
C	0,10	0,01	9,7

Le coefficient de variation inter-essai a été évalué à partir de 3 échantillons de différentes concentrations testés dans 10 dosages différents. La variabilité entre dosages est indiquée dans le tableau suivant :

Échantillon	Moyenne ng/ml	Déviat Standard ng/ml	C. V. %
A	0,62	0,04	5,7
B	0,28	0,02	7,4
C	0,14	0,01	10,5

#### 4. Sensibilité

La LoB (Limite of Blank) a été calculée en mesurant le blanc 20 fois et a été calculée comme la moyenne + 2 écarts-types de la distribution des valeurs de test; la LoB calculée est de 0,014 ng / ml.

La LoD (Limit of Detection) a été calculée comme la LoB + 1,645 écart type d'un échantillon à faible concentration testé dans 10 essais différents. La LoD calculée est de 0,025 ng / ml.

La LoQ (limite de quantification) a été calculée en testant 5 échantillons de faible valeur, 9 fois. La LoQ calculée est de 0,035 ng / ml.

#### 5. Spécificité

La spécificité a été calculée sur la base de l'interférence des composés suivants dont la structure est analogue à la  $rT_3$ . Le pourcentage d'interférence a été calculé d'après Abraham ( $x/y \times 100$ ) où x et y sont respectivement le poids de  $rT_3$  et de l'interfèrent qui causent une diminution de 50% de la capacité liante :

Substance interférente	Réaction croisée (%)
Triiodo-3,5,3' thyronine (Reverse $T_3$ )	100
Lévothyroxine ( $T_4$ )	0,22
Triiodo-3,5,3' thyronine ( $T_3$ )	0,024
Diiodo 3,3'-thyronine ( $T_2$ )	15
Diiodothyronine 3,5	0,0002
Acide 3,5,3' tri-iodothyroacétique (Triac)	0,023
Monoiodo-3-tyrosine (MIT)	0,0001
Diiodo-3,5-tyrosine (DIT)	0,0048
Acide acétylsalicylique	<0,0001
Phénylbutazone	<0,0001

Les effets potentiellement interférents de l'hémoglobine à 500 mg / dl, de la bilirubine à 100 mg / dl et des triglycérides à 250 mg / dl ont été évalués. Les résultats de ce test ne démontrent aucune interférence significative comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Substance interférente	Echantillon de sérum (ng/ml)	Echantillon de plasma (ng/ml)
-	0,53	0,18
Hémoglobine	0,55	0,18
Bilirubine	0,53	0,15
-	0,58	0,15
Triglycérides	0,51	0,17

# DE

## DIESER KIT IST NUR FÜR DIE IN - VITRO - DIAGNOSTIK BESTIMMT

R-EW-125 125 Determinations

### 1. VERWENDUNG

Der Testsatz Reverse T<sub>3</sub> dient der quantitativen Bestimmung von Reverse T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>) in humanem Serum oder Plasma.

### 2. PHYSIOLOGIE

3,3',5' Trijodthyronin (rT<sub>3</sub>) kann in Humanblut nachgewiesen werden (1). Nur 3% des rT<sub>3</sub>, das strukturell einem T<sub>4</sub>-Molekül ohne Jodatom in Position 5 entspricht, wird von der Schilddrüse synthetisiert; der Rest entsteht aus Monodeiodination von T<sub>4</sub>, wenn es an periphere Rezeptoren bindet, die aus Enzymen für die Produktion von T<sub>3</sub> oder rT<sub>3</sub> bestehen. Die Monodeiodination findet in vielen Organen statt, hauptsächlich aber in der Leber und den Nieren. Deshalb ist es möglich, dass anomale rT<sub>3</sub>-Werte aufgrund pathologischer Veränderungen auftreten, die nicht die Schilddrüse betreffen (2). Weil T<sub>3</sub> aktiv ist, während rT<sub>3</sub> inaktiv ist, kann die Produktion von rT<sub>3</sub> anstelle von T<sub>3</sub> aus T<sub>4</sub> zu verschiedenen metabolischen Veränderungen führen. Im Fruchtwasser sind die rT<sub>3</sub>-Werte sehr hoch; bei der Geburt führen hohe TSH-Werte zu einem schnellen Anstieg von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>, wenn auch in geringer Menge, die rT<sub>3</sub>-Werte bleiben aber einige Tage unverändert. Grund dafür kann eine geringe intrathyreoidale Speicherung von rT<sub>3</sub> sein. Aus diesem Grunde führt auch eine exogene Gabe von TSH nicht zu einem Anstieg der rT<sub>3</sub>-Werte bei gesunden Erwachsenen (3). Unter verschiedenen Bedingungen sind niedrige T<sub>3</sub>-Werte in Verbindung mit hohen rT<sub>3</sub>-Werten nachweisbar (4). Bei einigen systemischen Erkrankungen wie Leberzirrhose oder Proteinmangel tritt das sogenannte „Niedrig-T<sub>3</sub>-Syndrom“ auf (5): T<sub>3</sub>-Werte sind niedrig, rT<sub>3</sub>-Werte sind hoch. Außerdem wies Chopra das gleiche Verhältnis bei Neugeborenenseren nach (2). Dieser physiologische rT<sub>3</sub>-Anstieg kehrt zwischen dem 8. und 10. Lebensstag in den Normalbereich zurück, alle anderen Schilddrüsenparameter bereits innerhalb der ersten Lebenswoche. RT<sub>3</sub>-Profile wurden während der Schwangerschaft zur Ermittlung des Gestationsalters und des fetalen Befindens erstellt, auch wenn eindeutige-Korrelationen bis jetzt unbekannt sind.

### 3. TESTPRINZIP

Das Kit wurde für die quantitative Bestimmung von reversem T<sub>3</sub> in Serum oder Plasma durch RIA ohne vorherige Behandlung der Proben entwickelt.

Unmarkiertes Antigen (Patientenproben bzw. Standards) und radioaktiv markiertes Antigen sowie ein spezifisches Antiserum werden in definierten Mengen in einem Röhrchen gemischt und inkubiert. Die radioaktiv markierten und unmarkierten Antigene konkurrieren während der Inkubation um die begrenzte Anzahl der Antikörper-Bindungsstellen. In dieser Reaktion bilden markierte und unmarkierte Antigene mit dem Antikörper Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Komplexbildung strebt nach dem Massenwirkungsgesetz ein Gleichgewicht an. Nach der Inkubation wird die Trennung von freiem und gebundenem rT<sub>3</sub> mit Polyethylenglykol (PEG) durchgeführt. Anschließend wird mit dem Überstand das ungebundene Antigen dekantiert oder abgesaugt. Das im Röhrchen verbliebene Präzipitat wird im Gammacounter gemessen. Aus der Standardkurve können die rT<sub>3</sub>-Konzentrationen in den unbekanntenen Proben ermittelt werden.

### 4. REAGENZIEN

Bei größeren Testansätzen dürfen nur Reagenzien mit der gleichen Chargennummer verwendet werden. Die Chargennummern auf den Röhrchen und Reagenzien sollten mit denen auf dem Kontrolltestzertifikat übereinstimmen. Verwenden Sie die Kitkomponenten nur bis zum angegebenen Verfallsdatum. Der Reverse T<sub>3</sub> Kit enthält Reagenzien für 125 Einzelbestimmungen und ist bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 2-8°C haltbar.

Reagenz	125 Tests Kit	Farbcode	Rekonstitution
<b>ANTISERUM</b> Antikörper Tris-Puffer mit Anti-rT <sub>3</sub> -Antikörpern (Kaninchen), BSA und <0,1% Natriumazid	1 Fläschchen lyophilisiert		12.5 ml destilliertem Wasser
<b>Ag</b> <sup>125I</sup>	1 Fläschchen 13ml 75 kBq	Rot	Gebrauchsfertig
<b>CAL 0</b> Kalibrator 0 in Phosphatpuffer mit BSA und 0,05% Natriumazid	1 Fläschchen lyophilisiert	Gelb	2 mL destilliertem Wasser
<b>CAL N</b> Kalibrator - N = 7 in Phosphatpuffer mit BSA und 0,05% Natriumazid	7 Fläschchen lyophilisiert	Gelb	1 mL destilliertem Wasser
<b>CONTROLIN</b> Kontroll - N = 1 Humanserum mit <0,1% Natriumazid	1 Fläschchen lyophilisiert	Silber	1 mL destilliertem Wasser
<b>PEG SOLN</b> PEG Solution 20% Polyethylenglykol (PEG 6000) in Phosphatpuffer mit Tween 20 und <0,1% Natriumazid	2 Fläschchen 62.5ml		Gebrauchsfertig

- RT<sub>3</sub> Antikörper:** Den Inhalt des Fläschchens mit 12,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Lagerung nach Rekonstitution im gut verschlossenen Fläschchen 3 Tage bei 2-8°C oder länger bei -20°C bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum. NICHT WIEDERHOLT EINFRIEREN UND AUFTAUEN.
- RT<sub>3</sub> Kalibratoren:** Den Kalibrator 0 mit 2,0 ml, die übrigen Standards mit 1,0 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Lagerung nach Rekonstitution im gut verschlossenen Fläschchen 3 Tage bei 2-8°C oder länger bei -20°C bis zum auf den Fläschchenetiketten angegebenen Verfallsdatum. NICHT WIEDERHOLT EINFRIEREN UND AUFTAUEN. Der Wert jedes Kalibrators variiert von Charge zu Charge. Für den genaueren Wert verweisen wir auf das Fläschchenetikett.
- <sup>125</sup>I-RT<sub>3</sub> Reagenz:** Lagerung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum. NICHT EINFRIEREN.
- 20% TW PEG Lösung:** Vor Gebrauch gut mischen.
- Kontrollserum:** Den Inhalt des Fläschchens mit 1,0 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Lagerung nach Rekonstitution im gut verschlossenen Fläschchen 3 Tage bei 2-8°C oder länger bei -20°C bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum. NICHT WIEDERHOLT EINFRIEREN UND AUFTAUEN.

#### Anzeichen für vorzeitigen Verfall der Reagenzien:

- Feuchtigkeit in den lyophilisierten Reagenzien.
- Präzipitat in den rekonstituierten Reagenzien.

### 5 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zur In-vitro-Diagnostik.

Mit diesem Test sollte nur erfahrendes Laborpersonal arbeiten. Der Umgang sollte nach Maßgabe der „Guten Laborpraxis“ (GLP) erfolgen.

Radioaktives Material - Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Menschen oder Tieren.

Physikalisches Daten of <sup>125</sup>I: Ende die Arbeitsanleitung sehen

1. **Radioaktivität:** Der Kit sollte unter Strahlenschutzbedingungen gelagert werden. Es wird auf die Vorschriften der Strahlenschutzverordnung hingewiesen. Folgende Regeln gelten neben anderen bei der Handhabung von radioaktivem Material:

- Nicht rauchen, trinken oder essen.
- Hände möglichst mit Gummihandschuhen schützen.
- Verschüttete Lösungen sofort wegwischen und kontaminierte Geräte dekontaminieren. Einwegmaterialien werden zum radioaktiven Abfall gegeben. Ständige Arbeitsmittel sind wiederholt auf Kontamination hin zu prüfen.
- Radioaktiver Abfall muß grundsätzlich an eine Sammelstelle abgegeben werden. Eine Lagerung von kurzlebigen radioaktivem Abfall (z.B. <sup>125</sup>I) bis zum praktisch vollständigen Abklingen und seine anschließende Beseitigung wie normaler Abfall ist möglich, bedarf aber der Genehmigung der Aufsichtsbehörde.

Nach § 3 der Strahlenschutzverordnung dürfen wir radioaktive Reagenzien nur an Personen liefern, die im Besitz einer entsprechenden Umgangsgenehmigung sind.

2. **Natriumazid:** Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (<0,1%). Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden. Reagenzienreste sollten daher mit reichlich Wasser verdünnt beseitigt werden. Nicht mit der Haut oder Schleimhaut in Berührung bringen.

H370 sehr giftig bei Verschlucken  
EUH031 Kontakt mit Säuren befreit sehr giftiges Gas.

3. **Bestandteile humanen oder tierischen Ursprungs:** Einige Reagenzien enthalten Bestandteile humanen oder tierischen Ursprungs. Erstere wurden mit Immunoassays auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und Anti-HIV-Antikörper überprüft und negativ gefunden, Dennoch wird empfohlen, diese Reagenzien wie auch die Patientenproben als potentiell infektiös zu betrachten und entsprechend zu handhaben. Es ist wahrscheinlich, daß in dem Produkt Antikörper gegen das Hepatitis-C-Virus nachweisbar sind. Obwohl die Nachweisbarkeit von HCV-Antikörpern nicht zwingend bedeuten muß, daß die Materialien infektiös sind, sollten zur Vermeidung eines Ansteckungsrisikos geeignete Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung beachtet werden.

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

**Serum:** 5 ml venöses Blut in Glas- oder Plastikröhrchen ohne Zusätze bei Raumtemperatur (18-25°C) zur Gerinnung bringen und nach der Zentrifugation die Serumfraktion abtrennen.

**Plasma:** 5 ml venöses Blut in Glas- oder Plastikröhrchen mit Heparin, EDTA oder Natriumzitrat als Antikoagulantien zentrifugieren und die Plasmafraktion abtrennen.

**Lagerung:** Serum- und Plasmaproben können 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden, darüber hinaus müssen sie bei -20°C eingefroren werden. Nicht wiederholt auftauen und einfrieren. Trübe Proben vor der Testdurchführung zentrifugieren.

### Bekannte Interferenzen:

- Stark lipämische oder hämalytierte Proben.
- Kontamination der Proben oder Röhrchen mit <sup>125</sup>I oder anderen Radioisotopen.

**Verdünnung:** Die Proben können unverdünnt in den Assay eingesetzt werden. Falls Sie dennoch verdünnen wollen, verwenden Sie den rT<sub>3</sub>-Kalibrator 0.

Serum oder Plasma (EDTA und Heparin) liefern ähnliche Ergebnisse.

Y (Hep. Li-Plasma) = 0,95 x (Serum) + 0,01 r = 0,95 n = 20

Y (Hep. Na-Plasma) = 0,93 x (Serum) + 0,004 r = 0,89 n = 20

Y (EDTA-Plasma) = 0,88 x (Serum) + 0,01 r = 0,97 n = 20

## 7. ARBEITSANLEITUNG

### 1. Packungsinhalt

Der Reverse T<sub>3</sub>-Kit enthält folgende Komponenten:

Reagenz	Fläschchen
<sup>125</sup> I-RT <sub>3</sub> Reagenz	1
RT <sub>3</sub> Kalibratoren	8
RT <sub>3</sub> Antikörper	1
20% TW PEG Lösung	2
Kontrollserum	1

### 2. Zusätzlich benötigtes Material

- destilliertes Wasser.
- Teströhrchen (z.B. 11 x 70 mm).
- Präzisionspipetten mit Einmal-Spitzen; 0,1 - 0,2 und 1,0 ml.
- Pipetten.
- Vortex-Mischer.
- Zentrifuge.
- Gammacounter für <sup>125</sup>I.

### 3. Vorbereitung des Testansatzes

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen und vor Gebrauch sorgfältig mischen.

Für jeden Testansatz folgende Röhrchen in das Rack stellen (Doppelbestimmung):

- 2 Röhrchen für die Totalaktivität (TA).
- 2 Röhrchen für die NSB (nichtspezifische Bindung).
- 2 Röhrchen für B0 (maximale Bindung).
- 2 Röhrchen für jede Standardkonzentration.
- 2 Röhrchen für jede Probe oder Kontrolle.

### 4. Testdurchführung (Serum, Plasma):

- 0,1 ml der Kalibrators, Kontrolle und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren (Doppelbestimmung).
- 0,1 ml des Kalibrator 0 in die Röhrchen für B0 und 0,2 ml in die Röhrchen für die NSB pipettieren.
- 0,1 ml <sup>125</sup>I rT<sub>3</sub> Tracer in alle Röhrchen pipettieren.
- 0,1 ml rT<sub>3</sub> Antiserum in alle Röhrchen außer NSB und TA pipettieren.
- Mischen und 3 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
- 1,0 ml 20% TW PEG Solution in alle Röhrchen außer TA pipettieren.
- Auf einem Vortex-Mischer mischen und alle Röhrchen außer TA zentrifugieren. Wir schlagen folgende Kombinationsmöglichkeiten für die Zentrifugation vor:
  - \* 25 Minuten bei 2000 x g
  - \* 20 Minuten bei 2500 x g
  - \* 15 Minuten bei 3500 x g
- Dekantieren Sie oder saugen Sie den Überstand aus allen Röhrchen außer TA ab.
- Messen Sie die Aktivität in den Röhrchen mindestens eine Minuten in einem Gammacounter.

### 5. Testdurchführung für Fruchtwasserproben

Für Fruchtwasserproben ist der Zusatz eines Carrier-serums erforderlich, da die Proteinzusammensetzung des Fruchtwassers wesentlich von der des Serums abweicht. Das Carrier-serum für diesen rT<sub>3</sub>-Assay wird auf Anfrage zusätzlich von uns geliefert; es ist kein regelmäßiger Bestandteil des Kits.

### 6. Pipettierschema (Serum, Plasma, Fruchtwasser)

Röhrchen	Proben/Serotest	B0	K1-K7	NSB	TA
Probe/Serotest	0,1 ml	-	-	-	-
Nullkalibrator	-	0,1 ml	-	0,2 ml	-
Kalibrators	-	-	0,1 ml	-	-
<sup>125</sup> I rT <sub>3</sub> Tracer	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
rT <sub>3</sub> Antiserum	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	-	-
Mischen und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C).					
PEG Solution	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	-
Mischen (Vortex) und zentrifugieren. Anschließend dekantieren oder absaugen. Die Radioaktivität in allen Röhrchen mindestens 1 Minuten in einem Gammacounter messen.					

## 8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Von allen Doppelwerten (Standards, Kontrollserum und Patientenproben, nicht TA) wird der Mittelwert bestimmt und anschließend der Mittelwert der NSB subtrahiert.

Die cpm-Mittelwerte von B0 werden verwendet, um die prozentuale Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen (maximale Bindung) zu berechnen:

$$\frac{\text{cpm-Mittelwert B0}}{\text{cpm-Mittelwert der Totalaktivität}} \times 100 = \% \text{ Bindung}$$

Die relative prozentuale Bindung der Kalibrators und Proben wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{cpm-Mittelwert Kalibrator/Probe}}{\text{cpm-Mittelwert B0}} \times 100 = \% \text{ relative Bindung}$$

Die so errechneten relativen Bindungen werden auf semilogarithmischem Papier gegen die entsprechenden  $rT_3$ -Kalibrator-Konzentrationen aufgetragen.

Verdünnte Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Literaturhinweise zur automatisierten Auswertung siehe 12.0 (8,9).

### 0. Berechnungsbeispiel - Beispiel einer Standardkurve

Röhrchen	cpm-Mittelwert	B/T (%)	B/B0 (%)	Konzentration (ng/ml)
Totalaktivität	19649,1	-	-	-
NSB	652,5	3,32	-	-
B0	7869,2	36,73	-	-
K 1 0,02 ng/ml	7322,0	-	92,42	-
K 2 0,06 ng/ml	6499,8	-	81,02	-
K3 0,12 ng/ml	5354,3	-	65,15	-
K 4 0,33 ng/ml	4059,3	-	47,21	-
K 5 0,65 ng/ml	2941,4	-	31,72	-
K 6 1,15 ng/ml	2302,8	-	22,87	-
K 7 2,14 ng/ml	1703,4	-	14,56	-
Kontrollserum	3141,6	-	33,40	0,57

**Hinweis:** Diese Daten dienen als Beispiel und dürfen nicht anstelle der in jedem Testansatz zu ermittelnden Werte verwendet werden. Für den genauen Wert verweisen wir auf das Fläschchenetikett

### 1. Umrechnung

Umrechnung in SI-Einheiten:  $1 \text{ nmol/l} = 1 \text{ ng/ml} \times 1,54$ .

### INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

## 9. GRENZEN DES VERFAHRENS

Zur Erstellung der Diagnose sollte die Bestimmung von  $rT_3$  immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.

## 10. ERWARTETE WERTE

Serum von:	Konzentration (ng/ml)
Normale Männer und Frauen: 77 Proben	0,17-0,44

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### 1. Richtigkeit - Wiederfindung

Poolseren oder Plasma wurden vor und nach der Zugabe verschiedener Mengen von  $rT_3$  bestimmt, und die prozentuale Wiederfindung des zugefügten  $rT_3$  wurde berechnet.

Probe	zugefügtes $rT_3$ (ng/ml)	gemessenes $rT_3$ (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	0.83	0.70	84.4
	0.36	0.34	95.1
	0.13	0.11	81.1
	0.06	0.06	94.0
	0.02	0.02	107.9
2	0.96	0.81	85.1
	0.52	0.47	90.0
	0.15	0.14	91.5
	0.07	0.06	80.1

### 2. Richtigkeit - Linearität von Verdünnungen

Drei Plasmaproben wurden über mehrere Stufen mit  $rT_3$ -Nullkalibrator verdünnt, und die prozentuale Wiederfindung wurde berechnet.

Probe	Verdünnungs-Faktor	gemessenes $rT_3$ (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	1	1,79	100,0
	2	0,94	95,3
	4	0,44	102,1
	8	0,21	106,1
2	1	1,65	100,0
	2	0,48	97,4
	4	0,25	93,7
	8	0,12	100,4

### 3. Präzision

Die Intraassay-Variation (VK) wurde durch 12 fache Bestimmung von 3 verschiedenen Serumproben in einem Testansatz ermittelt.

Probe	Mittelwert ng/ml	Standardabweichung ng/ml	VK %
A	0,67	0,03	4,1
B	0,26	0,01	4,0
C	0,10	0,01	9,7

Die Interassay-Variation (VK) wurde durch die Bestimmung von 3 Serumproben in 10 verschiedenen Testansätzen ermittelt.

Probe	Mittelwert ng/ml	Standardabweichung ng/ml	VK %
A	0,62	0,04	5,7
B	0,28	0,02	7,4
C	0,14	0,01	10,5

### 4. Sensitivität

Der LoB (Limit of Blank) wurde durch 20-maliges Messen des Blindwerts berechnet und als Mittelwert + 2 Standardabweichung der Verteilung der Testwerte berechnet; Der berechnete LoB beträgt 0,014 ng / ml.

Die LoD (Nachweisgrenze) wurde als LoB + 1,645-Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration berechnet, die in 10 verschiedenen Läufen getestet wurde. Die berechnete LoD beträgt 0,025 ng / ml.

Der LoQ (Limit of Quantification) wurde durch 9-maliges Testen von 5 Proben mit niedrigen Werten berechnet. Der berechnete LoQ beträgt 0,035 ng / ml.

### 5. Spezifität

Potentiell kreuzreagierende Substanzen wurden Proben zugefügt und mit dem Testsatz  $rT_3$  bestimmt. Die Kreuzreaktion wurde nach Abraham ( $x/y \times 100$ ) berechnet, wobei x und y die Menge von  $rT_3$  und der kreuzreagierenden Substanz sind, die Bindung um 50% reduziert:

Substanz	Kreuzreaktion (%)
Reverse T <sub>3</sub>	100
L-Thyroxin (T <sub>4</sub> )	0,22
3,5,3'-Trijodthyronin (T <sub>3</sub> )	0,024
3,3'-Dijod-L-Thyronin	15
3,5-Dijod-L-Thyronin	0,0002
3,5,3'-Trijodthyoessigsäure (Triac)	0,023
3-Monojodthyrosin (MIT)	0,0001
3,5-Dijodthyrosin	0,0048
Acetylsalicylsäure	<0,0001
Phenylbutazon	<0,0001

n.n.= nicht nachweisbar

Die potenziell störenden Wirkungen von Hämoglobin bei 500 mg / dl, von Bilirubin bei 100 mg / dl und von Triglyceriden bei 250 mg / dl wurden bewertet. Die Ergebnisse dieses Tests zeigen keine signifikanten Störungen, wie in der folgenden Tabelle gezeigt.

Störsubstanz	Serumprobe (ng/ml)	Plasmaprobe (ng/ml)
-	0,53	0,18
Hämoglobin	0,55	0,18
Bilirubin	0,53	0,15
-	0,58	0,15
Triglyceride	0,51	0,17

201008

## SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

R-EW-125 125 Determinations

## 1. USO DEL PRODOTTO

Il kit consente la determinazione quantitativa mediante tecnica radioimmunologica di reverse T<sub>3</sub> in campioni di siero o plasma.

## 2. SIGNIFICATO DEL DOSAGGIO

La presenza di 3,3',5' Triiodotironina (reverse T<sub>3</sub> o rT<sub>3</sub>) nel sangue umano è dimostrata già da parecchi anni (1). La rT<sub>3</sub>, che strutturalmente corrisponde ad una molecola di T<sub>4</sub> privata di un atomo di iodio in posizione 5, nell'anello tirosinico, deriva per solo il 3% dalla tiroide, mentre per il restante 97% proviene dalla monodeiodazione della T<sub>4</sub>, nel momento in cui quest'ultima si lega al recettore periferico, che sarebbe quindi dotato di enzimi sia per la produzione di T<sub>3</sub> che di rT<sub>3</sub>. La monodeiodazione avverrebbe in vari organi, ma essa è prevalente soprattutto nel fegato e nel rene. Per questo motivo in varie situazioni patologiche non strettamente legate alla funzionalità tiroidea, è possibile rilevare livelli di rT<sub>3</sub> circolante (2). Dal momento che la T<sub>3</sub> è metabolicamente attiva mentre la rT<sub>3</sub> è inattiva, la eventuale modificazione del processo di deiodazione periferica della T<sub>4</sub> dalla formazione della T<sub>3</sub> a quella della reverse T<sub>3</sub> può produrre notevoli modificazioni metaboliche. Particolarmente elevati sono invece i livelli di rT<sub>3</sub> nel liquido amniotico; alla nascita l'aumento di TSH provoca un rapido incremento della T<sub>3</sub> e in misura minore della T<sub>4</sub>, mentre non influenza i livelli di rT<sub>3</sub> che permangono immutati per alcuni giorni. Questo si spiegherebbe con la scarsa disponibilità intratiroidea di rT<sub>3</sub>. Questo aspetto spiegherebbe anche il fatto che in seguito a somministrazione di TSH esogeno nell'adulto normale non si ottiene un rialzo di rT<sub>3</sub> (3). È interessante rilevare che le concentrazioni di rT<sub>3</sub> sono elevate in molte condizioni in cui i livelli sierici di T<sub>3</sub> sono inferiori alla norma (4). Questa variazione reciproca dei due ormoni è stata trovata in alcune malattie sistemiche tra cui la cirrosi epatica e in un gruppo di pazienti con dieta molto povera di proteine; questi quadri vengono generalmente definiti con la denominazione di «Low T<sub>3</sub> Syndrome» (5). Chopra ha dimostrato inoltre livelli alti di rT<sub>3</sub> e bassi di T<sub>3</sub> nel siero umano del neonato (2). Questo rialzo fisiologico dei valori di rT<sub>3</sub> si normalizza solo verso l'8<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> giornata dalla nascita, mentre tutti gli altri parametri tiroidei si assestano sui valori normali già nella prima settimana di vita (6). Il comportamento dei livelli di rT<sub>3</sub> durante la gravidanza è stato utilizzato per trarre informazioni circa l'età gestazionale e la vita fetale, anche se precise correlazioni a riguardo non si sono ancora trovate.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

Il Kit consente la determinazione quantitativa di reverse T<sub>3</sub> mediante tecnica radioimmunologica su campioni di siero o plasma, senza alcun trattamento preliminare del campione. L'antigene presente negli standards e nei campioni compete con il tracciante radioattivo (<sup>125</sup>I-RT<sub>3</sub>) per i siti di legame dell'anticorpo.

Dopo opportuna incubazione, la quantità di tracciante che si lega all'anticorpo è inversamente proporzionale alla quantità di antigene presente negli standards e nei campioni. La separazione B/F viene eseguita mediante aggiunta di polietilenglicole e il precipitato viene raccolto per centrifugazione.

Le principali fasi del dosaggio sono:

- Incubazione della miscela di reazione per 3 ore a temperatura ambiente (18-25°C);
- Precipitazione dell'immunocomplesso mediante l'aggiunta di polietilenglicole;
- Centrifugazione e decantazione o aspirazione;
- Conteggio della radioattività.

## 4. REAGENTI

**Non utilizzare reagenti di lotti differenti. I numeri dei lotti dei reagenti devono corrispondere a quelli dichiarati sul "Certificato di Analisi". Non usare il kit oltre la data di scadenza.**

Il kit Reverse T<sub>3</sub> contiene reagenti sufficienti per 125 tubi. Al ricevimento, conservare il kit a 2-8°C sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
<b>ANTISERUM</b> Antisiero Contenente antisiero liofilizzato anti-RT3 ottenuto da coniglio, in Tris con Albumina Bovina Sierica e sodio azide <0.1 % p/p	1 flaconcino Lyophilized		12.5 ml di acqua distillata
<b>Ag</b> <sup>125</sup> I TRACER : contiene RT3 marcato con I125 in tampone Tris con Sodio Azide <0.1%	1 flaconcino 13ml 75 kBq	rosso	<b>Pronta per l'uso</b>
<b>CAL 0</b> Calibratori 0 Contenenti RT3 liofilizzato (in tampone fosfato con albumina bovina sierica e sodio azide, 0.05% p/p)	1 flaconcino Lyophilized	giallo	2 ml di acqua distillata
<b>CAL N</b> Calibratori - N = 7 Contenenti RT3 liofilizzato (in tampone fosfato con albumina bovina sierica e sodio azide, 0.05% p/p)	7 flaconcini Lyophilized	giallo	1 ml di acqua distillata
<b>CONTROL N</b> Controlli - N = 1 Contenente siero umano liofilizzato con sodio azide	1 flaconcino Lyophilized	argento	1 ml di acqua distillata
<b>PEG</b> <b>SOLN</b> PEG Solution Contenente polietilenglicole MW 6000 in soluzione con tween 20 e sodio azide	2 flaconcini 62.5ml		<b>Pronta per l'uso</b>

1. **RT<sub>3</sub> Antisiero (verde):** La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. Conservare a 2-8°C. Ricostituire il contenuto del flacone con 12.5 ml di acqua distillata e mescolare delicatamente fino a completa solubilizzazione del liofilo. Dopo ricostituzione conservare a 4°C per 3 giorni o a -20°C per periodi più lunghi fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone.
2. **RT<sub>3</sub> Calibratori:** La data di scadenza è riportata sull'etichetta dei flaconi. Conservare a 2-8°C. Ricostituire il contenuto del flacone Calibratori 0 con 2 ml di acqua distillata e i rimanenti standard con 1 ml di acqua distillata. Mescolare delicatamente fino a completa solubilizzazione del liofilo. Dopo ricostituzione conservare a 4°C per 3 giorni o a -20°C per periodi più lunghi fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta dei flaconi. Il valore di ciascun calibratore varia da lotto a lotto. **Per il valore esatto, fare riferimento etichetta della fiala.**
3. **<sup>125</sup>I RT<sub>3</sub> :** La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. Conservare a 2-8 °C. Il reagente è pronto per l'uso, prima dell'utilizzo, agitare delicatamente per inversione evitando la formazione di schiuma ed assicurarsi che la temperatura sia  $\pm$ 18-25°C. Conservare a 2...8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone.
4. **Soluzione 20% TW PEG:** Conservare a 2-8°C. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. Il contenuto del flacone è pronto per l'uso. Conservare a 2...8°C. Non congelare.
5. **Siero di controllo :** Conservare a 2-8°C. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. Ricostituire il contenuto del



flacone con 1.0 ml di acqua distillata, mescolare delicatamente fino a completa solubilizzazione del liofilo evitando la formazione di schiuma. Conservare a 2...8°C per 1-2 giorni, per periodi più lunghi conservare a -20°C.

#### Indicazioni di Deterioramento dei Reagenti:

- Presenza di umidità nei sieri di controllo liofilizzati.
- Presenza di precipitato nei reagenti ricostituiti.

## 5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI D'USO

**Questo materiale è solo per uso diagnostico *in vitro*. Il kit è per solo uso professionale, deve quindi essere esclusivamente utilizzato da personale esperto di laboratorio, in conformità alle norme GLP.**

Caratteristica fisica<sup>125</sup>I: vedere alla fine della metodica

#### 1. Precauzioni: Materiale Radioattivo - Non per somministrazione interna od esterna ad esseri umani o animali.

Il materiale radioattivo può essere acquistato, ordinato e detenuto solo da personale medico, laboratori d'analisi, ospedali ed unicamente per uso diagnostico IN VITRO, non per somministrazione interna od esterna in esseri umani o animali. Il ricevimento, l'acquisto, il possesso, l'uso e il trasferimento di tale materiale è soggetto a regolamentazioni che possono differire da Nazione a Nazione.

Misure precauzionali nell'utilizzo di materiale radioattivo:

- Conservare il materiale radioattivo in apposite aree.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree destinate all'uso di materiali radioattivi.
- Non pipettare la soluzione radioattiva con la bocca.
- Indossare guanti durante l'utilizzo di materiale radioattivo e lavare accuratamente le mani dopo l'impiego di tale materiale.
- Coprire l'area di lavoro con carta assorbente a perdere.
- Ogni perdita accidentale di radioattivo deve essere trattata in accordo con le procedure stabilite.
- Tutti i materiali radioattivi vanno eliminati con appositi sistemi di smaltimento secondo le disposizioni emesse dagli organi di controllo con giurisdizione sul laboratorio.

#### 2. Rischio Biologico - Siero Umano: Il kit contiene reagenti preparati con siero o plasma umano. Il siero e il plasma impiegati sono stati testati con un metodo approvato dalla FDA e sono risultati negativi per la presenza d'anticorpi HIV-1/2, HCV e HBsAg. In ogni caso, poiché nessun metodo offre completa assicurazione che HIV-1/2, HCV, HBsAg o altri agenti infettivi siano assenti, questi reagenti dovrebbero essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati, con le stesse precauzioni adottate per altri campioni di siero o di plasma, al Biosafety Level 2 e secondo le disposizioni del manuale sanitario CDC (Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 3<sup>rd</sup> Edition, 1993.

#### 3. Rischio chimico - Sodio Azide (NaN<sub>3</sub>): La sodio azide è impiegata nei reagenti del kit ad una concentrazione finale non superiore allo 0.1%. La Sodio azide può reagire con tubature di scarico in piombo e rame formando azidi metalliche altamente esplosive. Quando si procede all'eliminazione del prodotto sciaccquare abbondantemente con acqua per evitare l'accumulo di azidi.

H370 molto tossico se ingerito. Contatto EUH031 con acidi libera gas molto tossici

## 6. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Possono essere utilizzati campioni di siero o plasma.

**Plasma:** aggiungere al prelievo un anticoagulante, centrifugare per 10 minuti e raccogliere il plasma.

**Siero:** lasciare il prelievo a temperatura ambiente (18-25°C) per consentire la formazione del coagulo e rimuoverlo. Centrifugare per 10 minuti e raccogliere il siero.

**Conservazione:** se il dosaggio è effettuato entro 24 ore dal prelievo conservare a 4°C; per tempi di conservazione più lunghi, conservare a -20°C, evitando di scongelare il campione più volte; se necessario frazionare in aliquote. Se dopo scongelamento il campione si presenta torbido è consigliabile centrifugarlo prima del dosaggio. Campioni fortemente lipemici o emolizzati devono essere scartati.

**Diluizioni:** i campioni devono essere dosati non diluiti. Eventuali diluizioni possono essere eseguite con lo calibratori 0 fornito con il kit.

Il siero o il plasma (EDTA ed eparina) forniscono risultati simili.

Y (hep. Li plasma) = 0,95 x (siero) + 0,01 r = 0,95 n = 20

Y (plasma hep. Na) = 0,93 x (siero) + 0,004 r = 0,89 n = 20

Y (plasma EDTA) = 0,88 x (siero) + 0,01 r = 0,97 n = 20

## 7. PROCEDURA

### 1. Materiali forniti

Il kit Reverse T<sub>3</sub>, sufficiente per 125 tubi, contiene i seguenti reagenti:

Reagenti	Quantità
RT <sub>3</sub> Antisiero	1
RT <sub>3</sub> Calibratori	8
I <sup>125</sup> RT <sub>3</sub>	1
Soluzione 20% Tween Peg	2
Siero di controllo	1

### 2. Materiali necessari ma non forniti con il kit

- Acqua distillata.
- Provette in plastica (circa 1 x 7 cm).
- Pipette automatiche a punte intercambiabili da 0.1 ml.
- Dispensatore ripetitivo per addizionare il PEG.
- Vortex.
- Pipette graduate.
- Centrifuga multicampione a bracci oscillanti.
- Gamma-Counter.

### 3. Descrizione del dosaggio

- Portare i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C) e mescolarli prima dell'uso.
- Per ogni dosaggio preparare 5 gruppi di provette:
  - 2 provette per radioattività totale;
  - 2 provette per «NSB» (controllo dei cpm aspecifici);
  - 2 provette per «B0» (concentrazione «0» di ormone freddo);
  - 2 provette per ogni calibratore;
  - 2 provette per ogni campione e Serotest.
- Pipettare nei rispettivi tubi da dosaggio 0.1 ml dei campioni da dosare, degli standards e dei Serotest. Nelle provette definite con B0 e NSB pipettare rispettivamente 0.1 e 0.2 ml di calibratori 0.
- Addizionare a tutte le provette 0.1 ml di I<sup>125</sup>-RT<sub>3</sub>.
- Addizionare a tutte le provette, eccetto che a NSB e a Radioattività Totale 0.1 ml di RT<sub>3</sub> Antiserum.
- Mescolare ed incubare per 3 ore a temperatura ambiente (18-25°C).
- Addizionare a tutti i tubi, eccetto che alla Radioattività Totale 1.0 ml di 20% TW PEG Solution.
- Mescolare il contenuto delle provette mediante Vortex.
- Centrifugare tutte le provette eccetto quelle della Radioattività Totale. Per la centrifugazione consigliamo di seguire una delle tre combinazioni:
  - 25 minuti a 2000 x g;
  - 20 minuti a 2500 x g;
  - 15 minuti a 3500 x g;
$$g = 1.1178 \times 10^5 \times n^2 \times r;$$
 (g= gravità; r = raggio in cm; n = numero di giri/minuto).
- Eliminare accuratamente il sovrantante per decantazione o per aspirazione.
- Leggere tutte le provette per almeno 1 minuto nel Gamma-Counter.

### 4. Schema di procedimento del dosaggio (i volumi sono espressi in ml)

Reattivi	Tubi	Campioni	Bo	Calibratori	NSB	Radioattività Totale
Campioni o serotest		0,1	-	-	-	-
Calibratore 0		-	0,1	-	0,2	-
Calibratori		-	-	0,1	-	-
I <sup>125</sup> -RT <sub>3</sub>		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
RT <sub>3</sub> Antiserum		0,1	0,1	0,1	-	-
Mescolare ed incubare per 3 ore a temperatura ambiente (18-25°C).						
20% TW PEG Solution		1,0	1,0	1,0	1,0	-
Mescolare su vortex e centrifugare. Aspirare o decantare (eccetto Radioattività Totale). Contare tutte le provette nel Gamma-Counter per almeno 1 minuto.						

## 8. CALCOLO DEI RISULTATI

Suggeriamo di sottrarre a tutte le letture eccetto che a quelle della Radioattività Totale la media dei cpm di NSB. La media dei cpm legati nei B0 viene usata per calcolare la percentuale di legame in assenza di antigene freddo (legame massimo).

$$\frac{\text{Media cpm legati nei B0}}{\text{Media cpm di Radioattività Totale}} \times 100 = \% \text{ di legame}$$

Calcolare la percentuale di legame per ogni calibratore, campione e serotest con la seguente formula:

$$\frac{\text{Media cpm legati (calibratori, campioni e serotest)}}{\text{Media cpm legati nei B0}} \times 100 = \% \text{ di inibizione}$$

Disegnare la curva dose-risposta ponendo le percentuali di inibizione ottenute per ogni dose di standard, contro le varie concentrazioni di standard, usando carta semilogaritmica e riportando sull'ascissa le dosi standard e sull'ordinata le percentuali di inibizione.

Interpolando sul grafico della curva le percentuali di inibizione si ricavano le corrispondenti concentrazioni di ormone in ng/ml. Per campioni diluiti è necessario moltiplicare il valore letto in curva per l'opportuno fattore di diluizione.

Per metodi di calcolo mediante computer consigliamo di consultare la bibliografia allegata (8, 9). L'utilizzatore, in base alle caratteristiche del dosaggio, potrà scegliere il metodo di calcolo e l'espressione grafica che consentono di ottenere il trattamento di risultati più idoneo.

### 1. Esempio di calcolo - Curva Tipica Standard

Descrizione	Media cpm	B/T (%)	B/B0 (%)	Dose (ng/ml)
Radioattività Totale	19649,1	-	-	-
NSB	652,5	3,32	-	-
B0	7869,2	36,73	-	-
C 1 0,02 ng/ml	7322,0	-	92,42	-
C 2 0,06 ng/ml	6499,8	-	81,02	-
C 3 0,12 ng/ml	5354,3	-	65,15	-
C 4 0,33 ng/ml	4059,3	-	47,21	-
C 5 0,65 ng/ml	2941,4	-	31,72	-
C 6 1,15 ng/ml	2302,8	-	22,87	-
C 7 2,14 ng/ml	1703,4	-	14,56	-
Controllo	3141,6	-	33,40	0,57

I dati non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore. Per il valore esatto, fare riferimento etichetta della fiala.

### CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

### 9. LIMITI DEL DOSAGGIO

1. È necessario, per il buon andamento del dosaggio, attenersi scrupolosamente alle istruzioni qui riportate.
2. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza riportata sulla etichetta dei flaconi.
3. Non mescolare reagenti di lotti differenti.
4. Dopo ricostituzione e conservazione a 4°C, i reagenti devono essere usati una sola volta. Per periodi superiori ai tre giorni, è necessario congelare i reagenti a -20°C. Dopo il congelamento lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (18-25°C) gradualmente, evitando l'uso di bagnomaria a 37°C. Evitare di scongelare i reagenti più di una volta, se necessario frazionare in aliquote.
5. Campioni contaminati da radioattività possono fornire risultati inaccurati.

## 10. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Siero di:	Concentrazione (ng / ml)
Uomini e donne normali: 77 campioni	0,17-0,44

Consigliamo che ogni laboratorio determini il proprio range di normalità.

Conversione in unità internazionali o nmol/l: nmol/l = ng/ml • 1.54.

## 11. PERFORMANCE

### 1. Accuratezza

Il test di recupero è stato eseguito aggiungendo quantità note di rT<sub>3</sub> a un pool di sieri o plasma. I valori di rT<sub>3</sub> sono stati determinati prima e dopo l'aggiunta ed è stata calcolata la percentuale di recupero del rT<sub>3</sub> aggiunto.

Campione	rT <sub>3</sub> aggiunto (ng/ml)	rT <sub>3</sub> misurato (ng/ml)	% Recupero
1	0,83	0,70	84,4
	0,36	0,34	95,1
	0,13	0,11	81,1
	0,06	0,06	94,0
	0,02	0,02	107,9
2	0,96	0,81	85,1
	0,52	0,47	90,0
	0,15	0,14	91,5
	0,07	0,06	80,1

### 2. Diluizione

In uno studio di diluizione campioni di plasma a concentrazione elevata di rT<sub>3</sub> sono stati diluiti con lo calibratore zero e ne sono state determinate le percentuali di recupero.

Campione	Fattore	rT <sub>3</sub> misurato (ng/ml)	% Recupero
1	1	1,79	100,0
	2	0,94	95,3
	4	0,44	102,1
	8	0,21	106,1
2	1	1,65	100,0
	2	0,48	97,4
	4	0,25	93,7
	8	0,12	100,4

### 3. Precisione

Il coefficiente di variazione Intra-Saggio è stato valutato usando 3 campioni a diverse concentrazioni, testati 12 volte nello stesso dosaggio. La variabilità Intra-Saggio è mostrata nella tabella seguente:

Campione	Media ng/ml	Deviazione standard ng/ml	C. V. %
A	0,67	0,03	4,1
B	0,26	0,01	4,0
C	0,10	0,01	9,7

Il coefficiente di variazione Inter-Saggio è stato valutato usando 3 campioni a diverse concentrazioni testati in 10 differenti dosaggi. La variabilità tra dosaggi è mostrata nella tabella seguente:

Campione	Media ng/ml	Deviazione standard ng/ml	C. V. %
A	0,62	0,04	5,7
B	0,28	0,02	7,4
C	0,14	0,01	10,5

### 4. Sensibilità

Il LoB (limite del bianco) è stato calcolato misurando il bianco 20 volte ed è stato calcolato come media + 2 Deviazione Standard della distribuzione dei valori di prova; il LoB calcolato è 0,014 ng / ml.

Il LoD (Limit of Detection) è stato calcolato come deviazione standard LoB + 1.645 di un campione a bassa concentrazione testato in 10 serie diverse. Il LoD calcolato è 0,025 ng / ml.

Il LoQ (limite di quantificazione) è stato calcolato testando 5 campioni di valori bassi, 9 volte. Il LoQ calcolato è 0,035 ng / ml.

## 5. Specificità

La specificità è stata calcolata in base alla interferenza dei seguenti composti a struttura analoga alla  $rT_3$ . La percentuale di interferenza è stata calcolata secondo il metodo di Abraham ( $x/y \times 100$ ) dove x e y sono rispettivamente il peso della  $rT_3$  e dell'interferente tali da causare un abbassamento del 50% della capacità legante:

Sostanza interferente	Cross-Reazione (%)
L-3,3',5'-Triiodotironina (Reverse $T_3$ )	100
L-Tiroxina ( $T_4$ )	0,22
3,5,3'-Triiodotironina ( $T_3$ )	0,024
3,3'-Diiodotironina ( $T_2$ )	15
3,5-Diiodotironina	0,0002
3,5,3'-Acido Triiodotiroacetico (Triac)	0,023
3-Monoiodotirosina (MIT)	0,0001
3,5-Diiodotirosina (DIT)	0,0048
Acido Acetilsalicilico	<0,0001
Fenilbutazone	<0,0001

Sono stati valutati gli effetti potenzialmente interferenti dell'emoglobina a 500 mg / dl, della bilirubina a 100 mg / dl e dei trigliceridi a 250 mg / dl. I risultati di questo test non dimostrano alcuna interferenza significativa come mostrato nella tabella seguente.

Sostanza interferente	Campione di siero (ng/ml)	Campione di plasma (ng/ml)
-	0,53	0,18
Emoglobina	0,55	0,18
Bilirubina	0,53	0,15
-	0,58	0,15
Trigliceridi	0,51	0,17

201008

## SÓLO PARA USO EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

R-EW-125 125 Determinations

### 1. USO PREVISTO

El kit permite emplear la técnica de radioinmunoensayo (RIA) para la determinación cuantitativa de  $T_3$  inversa en muestras de suero o plasma.

### 2. EXPLICACIÓN DEL TEST

La presencia de triyodotironina 3,3',5' ( $rT_3$ ) en la sangre humana se ha demostrado hace varios años (1). La glándula tiroidea sintetiza sólo el 3% de  $rT_3$ , que corresponde estructuralmente a una molécula  $T_4$  sin átomo de yodo en la posición 5. El resto se origina en la monodesyodación de  $T_4$ , cuando el último enlaza receptores periféricos que consisten en enzimas para la producción de  $T_3$  o  $rT_3$ . La monodesyodación se produce en muchos órganos, pero el hígado y el riñón son los principales puntos de conversión. Por ello es posible detectar niveles anómalos de  $rT_3$  debidos a situaciones patológicas que no implican la función tiroidea (2). Dada la actividad de  $T_3$ , que coincide con la inactividad de  $rT_3$ , la producción de  $rT_3$  en lugar de  $T_3$  a partir de  $T_4$  puede determinar diversas modificaciones metabólicas. En el fluido amniótico, los niveles de  $rT_3$  son muy altos; en el nacimiento los elevados niveles de TSH determinan un rápido incremento de  $T_3$  y  $T_4$ , aunque sea en pequeñas cantidades, pero los niveles de  $rT_3$  permanecen inmutables durante varios días. Esta situación puede deberse al pequeño almacenamiento intratiroideo de  $rT_3$ . Por igual motivo, la administración de TSH exógena no aumenta los niveles de  $rT_3$  en los adultos normales (3). Es muy interesante subrayar que en varios casos asociados con valores de  $T_3$  bajos, es detectable la concentración elevada de  $rT_3$  (4). Algunas enfermedades sistémicas, como la cirrosis hepática y la desnutrición proteínica se denominan "síndrome de  $T_3$  baja" (5). Estas patologías están asociadas con bajos niveles de  $T_3$ , con altos niveles simultáneos de  $rT_3$ . Además, Chopra demostró la misma situación en el suero de recién nacidos (2). Este incremento fisiológico de  $rT_3$  recupera la normalidad sólo en un plazo de 8 a 10 días de vida, en tanto que todos los parámetros tiroideos vuelven a la normalidad en la primera semana de vida (6). El perfil de  $RT_3$  durante el embarazo se ha utilizado para revelar el tiempo de gestación y el bienestar del feto, aunque aún se desconocen las correlaciones.

### 3. PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El kit se ha diseñado para la determinación cuantitativa, mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), de  $T_3$  inversa en muestras de suero o plasma, sin aplicar tratamiento preliminar alguno a las muestras.

El antígeno de los estándares o muestras compete con el isótopo radioactivo ( $I^{125}$ - $RT_3$ ) por los sitios de unión del anticuerpo. Tras la incubación, la cantidad de isótopo radioactivo unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de antígenos presente en los estándares o en las muestras. La fracción unida se separa de la fracción libre mediante la adición de glicol polietileno y el inmunocomplejo se obtiene por centrifugación.

Los pasos más importantes de este ensayo son los siguientes:

- Incubación de la mezcla reactiva durante 3 horas a temperatura ambiente (18-25°C).
- Precipitación de inmunocomplejo mediante glicol polietileno.
- Centrifugación y decantación o aspiración.
- Medición de radioactividad.

### 4. REACTIVOS

No utilice reactivos de lotes diferentes. Consulte los números de lote de los reactivos en el "Certificado de Análisis". No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad.

El kit Reverse contiene reactivos suficientes para 125 tubos. Conserve el kit a una temperatura de 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la caja.

Reactivos	Kit 125 tests	Código de color	Reconstitución
<b>ANTISERUM</b> Antisuero Contiene $RT_3$ obtenido en conejos en tampón Tris con albúmina sérica bovina y azida sódica al 0,1%	1 Vial Liofilizado		12.5 ml de agua destilada
<b>Ag</b> $^{125}I$ TRACER : contiene $RT_3$ etiquetada con $^{125}I$ en tampón Tris con azida sódica al 0,1%	1 Vial 13ml 75 kBq	Rojo	Lista para usar
<b>CAL 0</b> Calibrador 0 tampón fosfato con albúmina sérica bovina y azida sódica al 0,05%	1 Vial Liofilizado	Amarillo	2 ml de agua destilada
<b>CAL N</b> Calibradores - N = 7 tampón fosfato con albúmina sérica bovina y azida sódica al 0,05%	7 Viales Liofilizado	Amarillo	1 ml de agua destilada
<b>CONTROL N</b> Control - N = 1 suero humano liofilizado con azida sódica	1 Vial Liofilizado	Plata	1 ml de agua destilada
<b>PEG SOLN</b> PEG Solution contiene glicol polietileno al 20% en tampón fosfato con Tween 20 al 0,1% y azida sódica al 0,1%	2 Viales 62.5ml		Lista para usar

- Antisuero  $RT_3$ :** La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C. Reconstituya el contenido del frasco con 12,5 ml de agua destilada y mezcle con suavidad hasta la total solubilización de los residuos de suero liofilizado. Una vez reconstituido puede conservarlo durante 3 días a una temperatura de 4°C, o a -20°C por un periodo más prolongado hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco.
- Calibradores  $RT_3$ :** La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. Conservar a una temperatura de 2 a 8°C. Reconstituya el contenido del frasco de calibrador 0 con 2 ml de agua destilada, y utilice 1 ml de agua destilada para reconstituir los demás estándares. Mezcle con suavidad hasta la total solubilización de los residuos de suero liofilizado. Una vez reconstituido puede conservarlo durante 3 días a una temperatura de 4°C, o a -20°C por un periodo más prolongado hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El valor de cada calibrador varía de un lote a otro. **Para obtener el valor exacto, consulte la etiqueta del vial.**
- $I^{125}$ -  $T_3$  Inversa:** El reactivo está listo para su utilización. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. El reactivo está listo para el uso. Espere hasta que se encuentre a temperatura ambiente (18-25°C) y, a continuación, mézclelo bien antes de usarlo invirtiendo ligeramente el frasco, sin que se forme espuma. Conserve a una temperatura de 2°C a 8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- solución TW PEG al 20%:** La solución está lista para el uso. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No congelar.
- Suero de control :** Conservar a una temperatura de 2 a 8°C. La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta del frasco. Reconstituya el contenido del frasco con 1 ml de agua destilada y mezcle con suavidad hasta la total solubilización de los residuos de suero liofilizado. Puede conservarlo durante 1-2 días a una

temperatura de 2 a 8°C, o a -20°C durante un periodo de tiempo más prolongado.

#### 6. Indicaciones de deterioro del reactivo

1. Humedad en cualquiera de los reactivos liofilizados.
2. Precipitación en cualquiera de los reactivos reconstituidos, excepto en la solución PEG.

### 5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA EL USUARIO

#### Para uso diagnóstico *in vitro*.

**Sólo el personal de laboratorio experimentado debe utilizar esta prueba y la manipulación debe hacerse de acuerdo con GLP.**

**Material radioactivo. Se recomienda evitar su administración por vía interna o externa a seres humanos o animales.**

La compra, solicitud, posesión y uso de este material radioactivo sólo se autoriza a médicos, laboratorios clínicos u hospitales con el propósito exclusivo de realizar pruebas clínicas y de laboratorio *in vitro* que no conlleven la administración del material por vía interna o externa, ni la exposición de seres humanos o animales a sus radiaciones. Su compra, solicitud, posesión, uso y transferencia están sujetos a las normativas de cada país.

Características físicas <sup>125</sup>I: se encuentran al final

#### 1. Medidas de seguridad: Al manipular material radioactivo es conveniente aplicar las siguientes medidas:

- Guarde el material radioactivo en las zonas destinadas a este fin.
- No coma, beba, fume ni se maquille en zonas en las que se manipulen materiales radioactivos.
- No utilice la pipeta con la boca.
- Utilice guantes para manipular materiales radioactivos y lávese bien las manos cuando termine.
- Cubra el área de trabajo con papel secante desechable.
- Limpie bien el líquido derramado de inmediato y deseche los materiales contaminados de la misma forma que los residuos radioactivos.
- Si las normativas locales lo permiten, puede eliminar los residuos radioactivos líquidos a través del sistema municipal de alcantarillado.

#### 2. RIESGOS QUÍMICOS de la azida sódica (NaN<sub>3</sub>): Algunos de los reactivos incluidos en este kit contienen azida sódica como conservante. Para dichos reactivos, la concentración de azida sódica es 0,1%. Dado que la azida sódica puede dar lugar a la formación de azidas explosivas de cobre o plomo en las tuberías, se recomienda eliminar los reactivos no radioactivos a través del desagüe mediante abundantes descargas de agua.

H370 muy tóxico si se ingiere.  
EUH031 contacto con ácidos libera gas muy tóxico

#### 3. MATERIAL CON POSIBLE RIESGO BIOLÓGICO: Este kit puede contener algunos reactivos elaborados con suero o plasma humano. El resultado obtenido con el método de prueba aceptado por la FDA (Organismo para el control de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.) demuestra que el plasma o suero utilizado no es reactivo para anticuerpos HIV-1/2, HCV y HBsAg. Dado que no existe ningún método que garantice la total ausencia de anticuerpos HIV-1/2, HCV, HbsAg u otros agentes infecciosos, es preciso aplicar el nivel de seguridad biológica 2 al manipular estos reactivos, de conformidad con las recomendaciones relacionadas con las muestras de suero o sangre humana potencialmente infecciosas del manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Seguridad biológica en laboratorios microbiológicos y biomédicos), 3ª Edición, 1993, publicado por los Centros de Control de Enfermedades y el Instituto Nacional de la Salud.

### 6. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

En este ensayo se pueden utilizar muestras de suero o plasma.

**Plasma:** añada un anticoagulante, centrifugue durante 10 minutos y extraiga el plasma.

**Suero:** deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25°C). Centrifugue durante 10 minutos y extraiga el suero.

**Conservación:** la muestra puede conservarse a una temperatura de 4°C si el ensayo se realiza en las 24 horas siguientes a la extracción, y

a -20°C durante un periodo de tiempo más prolongado. Evite descongelar la muestra más de una vez y fraccíonela en caso necesario. Después de la descongelación se recomienda centrifugar las muestras turbias antes de realizar el ensayo. No emplee muestras altamente lipémicas o muy hemolizadas.

**Diluciones:** en el ensayo se pueden utilizar muestras sin diluir. En caso de diluir las muestras, tendrá que utilizar el calibrador 0 suministrado en el kit.

El suero o plasma (EDTA y heparina) proporciona resultados similares.

Y (hep. Li plasma) = 0,95 x (suero) + 0,01 r = 0,95 n = 20

Y (hep. Na plasma) = 0,93 x (suero) + 0,004 r = 0,89 n = 20

Y (plasma EDTA) = 0,88 x (suero) + 0,01 r = 0,97 n = 20

### 7. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

#### 1. Materiales suministrados

El kit Reverse T<sub>3</sub>, suficiente para 125 tubos, contiene los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Antisuero Reverse T <sub>3</sub>	1
Calibradores Reverse T <sub>3</sub>	8
Reverse I <sup>125</sup> T <sub>3</sub>	1
Solución Tween Peg al 20%	2
Suero de control	1

#### 2. Equipo necesario no suministrado con el kit

- Agua destilada
- Pipetas graduadas
- Tubos de ensayo plásticos (aprox. 1 x 7 cm).
- Micropipetas automáticas con punta desechable (0,1 ml)
- Mezclador vorticial
- Contador de rayos gamma
- Centrifugador de varias muestras
- Dispensador automático para añadir la solución PEG

#### 3. Procedimiento de prueba

Espere hasta que los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (18-25°C) y mézclelos suavemente antes de usarlos.

- Para cada ensayo, prepare los 5 grupos de tubos siguientes:
  - 2 tubos para el recuento de radioactividad total
  - 2 tubos para UNE (unión no específica)
  - 2 tubos para B0 (concentración "0" de antígeno frío)
  - 2 tubos para cada calibrador
  - 2 tubos para cada muestra y suero de control.
- Utilice la pipeta para introducir 0,1 ml de la muestra, estándar y suero de control en los tubos correspondientes.
- Introduzca con la pipeta 0,1 ml y 0,2 ml de calibrador 0 en los tubos B0 y UNE, respectivamente
- Añada 0,1 ml de isótopo radioactivo RT<sub>3</sub> I<sup>125</sup> a todos los tubos.
- Añada 0,1 ml de antisuero RT<sub>3</sub> a todos los tubos, excepto los UNE y los que se utilizan para determinar la radioactividad total.
- Mezcle e incube durante 3 horas a temperatura ambiente (18-25°C).
- Añada 1,0 ml de solución TW PEG al 20% a cada tubo, excepto los que se utilizan para determinar la radioactividad total.
- Aplique la mezcla vorticial y centrifugue todos los tubos, excepto los que permiten medir la radioactividad total.  
Centrifugue:
  - 25 minutos a 2000 x g;
  - 20 minutos a 2500 x g;
  - 15 minutos a 3500 x g;
- $g = 1,1178 \times 10^{-5} \times r \times n^2$ ; (g=gravedad; n = número de revoluciones/minuto; r = radio en cm).
- Elimine cuidadosamente el líquido sobrenadante mediante decantación o aspiración (excepto radioactividad total).
- Introduzca cada tubo en un contador de rayos gamma durante al menos 1 minuto.

#### 4. Procedimiento de ensayo

El volumen se expresa en ml

Reactivos	Tubos	Muestra	Bo	Estándar	NSB	Radioactividad Total
Muestras o suero de control		0,1	-	-	-	-
Calibrador 0		-	0,1	-	0,2	-
Calibradores		-	-	0,1	-	-
<sup>125</sup> I-RT <sub>3</sub>		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antisuero RT3		0,1	0,1	0,1	-	-
Mezcle e incube durante 3 horas a temperatura ambiente (18-25°C).						
Solución TW PEG al 20%		1,0	1,0	1,0	1,0	-
Aplique la mezcla vorticial y centrifugue. Aspire o decante (excepto radioactividad total). Introduzca todos los tubos en un contador de rayos gamma durante al menos 1 minuto.						

## 8. RESULTADOS

El valor medio de desintegraciones de UNE (unión no específica) puede restarse de todos los valores promedio, a excepción de la radioactividad total. El valor medio de desintegraciones de B0 permite calcular el porcentaje de unión en ausencia de antígeno frío (unión máxima).

$$\frac{\text{Media de desintegración B0}}{\text{Valor medio de desintegración radioactiva total}} \times 100 = \% \text{ de unión}$$

El porcentaje de unión relativa de cada estándar y muestra se calcula con la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Media de desintegraciones (estándar, muestra o Serotest)}}{\text{Media de desintegración B0}} \times 100 = \% \text{ de unión relativa}$$

Para dibujar la curva de respuesta a la dosis, trace en papel semilogarítmico el porcentaje de unión relativa de cada estándar (eje y) en función de la concentración relativa (eje x).

Al interpolar en la curva estándar el porcentaje de unión relativa de cada muestra, se obtiene la concentración de antígeno de la muestra en ng/ml. Para las muestras diluidas es necesario multiplicar el valor registrado en la curva estándar por el valor de dilución.

Consulte la información relacionada con el cálculo automatizado de datos en la bibliografía (8, 9). Puede elegir el método de cálculo y la representación gráfica que garantiza un tratamiento de datos óptimo en función de las características del ensayo.

### 1. Ejemplo de cálculo de una curva estándar representativa

Tubos	Media dpm	B/T (%)	B/B0 (%)	Concentraciones (ng/ml)
Radioactividad total	19649,1	-	-	-
UNE	652,5	3,32	-	-
B0	7869,2	36,73	-	-
C 1 0,02 ng/ml	7322,0	-	92,42	-
C 2 0,06 ng/ml	6499,8	-	81,02	-
C 3 0,12 ng/ml	5354,3	-	65,15	-
C 4 0,33 ng/ml	4059,3	-	47,21	-
C 5 0,65 ng/ml	2941,4	-	31,72	-
C 6 1,15 ng/ml	2302,8	-	22,87	-
C 7 2,14 ng/ml	1703,4	-	14,56	-
Suero de control	3141,6	-	33,40	0,57

No utilice los resultados de este ejemplo en lugar de los datos obtenidos durante el ensayo.

Para obtener el valor exacto, consulte la etiqueta del vial.

### CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia

- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de los resultados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

## 9. LIMITACIONES

1. Para obtener resultados fiables es necesario seguir estrictamente las instrucciones incluidas en el folleto del envase.
2. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco.
3. No mezcle reactivos de lotes diferentes.
4. Después de la reconstitución, conserve los reactivos a 4°C durante 3 días en los frascos herméticamente sellados. Una vez reconstituidos y conservados a 4°C, los reactivos sólo pueden utilizarse una vez. Para un periodo de conservación superior a 3 días, congele los reactivos a -20°C. Los reactivos congelados deben descongelarse de forma gradual a temperatura ambiente (18-25°C). No los ponga al baño maría a 37°C antes de usarlos. No descongele las muestras más de una vez.
5. Las muestras contaminadas con radioactividad pueden dar lugar a resultados inexactos.

## 10 VALORES ESPERADOS

Suero de:	Concentración (ng / ml)
Hombres y mujeres normales: 77 muestras	0,17-0,44

Es aconsejable que cada laboratorio defina un rango de valores normales propio.

Conversión a unidades internacionales o nmol/l: nmol/l = ng/ml • 1,54.

## 11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 1. Precisión

En los estudios de recuperación realizados se añadió rT<sub>3</sub> a un pool de muestras de suero o plasma. Los valores de RT<sub>3</sub> se determinaron antes y después de la adición, y se calculó el porcentaje de recuperación de rT<sub>3</sub> añadido.

Muestra	rT <sub>3</sub> añadido (ng/ml)	rT <sub>3</sub> medido (ng/ml)	% de recuperación
1	0,83	0,70	84,4
	0,36	0,34	95,1
	0,13	0,11	81,1
	0,06	0,06	94,0
	0,02	0,02	107,9
2	0,96	0,81	85,1
	0,52	0,47	90,0
	0,15	0,14	91,5
	0,07	0,06	80,1

### 2. Dilución

En el estudio de dilución se utilizó el calibrador cero para diluir las muestras de plasma y luego se determinó el porcentaje de recuperación.

Muestra	Factor de dilución	rT <sub>3</sub> medido (ng/ml)	% de recuperación
1	1	1,79	100,0
	2	0,94	95,3
	4	0,44	102,1
	8	0,21	106,1
2	1	1,65	100,0
	2	0,48	97,4
	4	0,25	93,7
	8	0,12	100,4

### 3. Precisión

El coeficiente de variación intraensayo (C.V.) ha sido evaluado en tres muestras medidas 12 veces durante el ensayo. La variabilidad intraensayo es la siguiente:

Muestra	Media ng/ml	Desviación Estándar ng/ml	C. V. %
A	0,67	0,03	4,1
B	0,26	0,01	4,0
C	0,10	0,01	9,7

El coeficiente de variación interensayo (C.V.) se evaluó con tres muestras de plasma en 10 ensayos diferentes. La variabilidad interensayo es la siguiente:

Muestra	Media ng/ml	Desviación Estándar ng/ml	C. V. %
A	0,62	0,04	5,7
B	0,28	0,02	7,4
C	0,14	0,01	10,5

### 4. Sensibilidad

El LoB (Límite de blanco) se calculó midiendo el blanco 20 veces y se calculó como la media + 2 Desviación Estándar de la distribución de los valores de prueba; el LoB calculado es 0.014 ng / ml.

El LoD (Límite de detección) se calculó como la desviación estándar LoB + 1.645 de una muestra de baja concentración probada en 10 análisis diferentes. El LoD calculado es 0.025 ng / ml.

El LoQ (Límite de cuantificación) se calculó probando 5 muestras de valores bajos, 9 veces. La LoQ calculada es 0.035 ng / ml.

### 5. Especificidad

La especificidad se ha evaluado en función de la interferencia de los compuestos siguientes, similares a rT3, y el porcentaje de interferencia se ha calculado de acuerdo con el método de Abraham ( $x/y \cdot 100$ ), donde x e y corresponden respectivamente al peso de rT3 y el compuesto de interferencia para que la capacidad de unión se reduzca en un 50%:

Compuesto	% de reacción cruzada
Reverse T <sub>3</sub>	100
L-tiroxina (T <sub>4</sub> )	0,22
Triyodotiroxina 3,5,3' (T <sub>3</sub> )	0,024
L-Diyodotironina 3,3'	15
L-Diyodotironina 3,5'	0,0002
Ácido triyodotiroacético 3,5,3' (Triac)	0,023
Monoyodotirosina (MIT) 3	0,0001
Diyodotirosina (DIT) 3,5	0,0048
Ácido acetilsalicílico	<0,0001
Fenilbutazona	<0,0001

Se han evaluado los efectos potencialmente interferentes de la hemoglobina a 500 mg / dl, de la bilirrubina a 100 mg / dl y de los triglicéridos a 250 mg / dl. Los resultados de esta prueba no demuestran ninguna interferencia significativa como se muestra en la tabla a continuación.

Sustancia interferente	Muestra de suero (ng/ml)	Muestra de plasma (ng/ml)
-	0,53	0,18
Hemoglobina	0,55	0,18
Bilirrubina	0,53	0,15
-	0,58	0,15
Triglicéridos	0,51	0,17

**12 BIBLIOGRAPHIE – BIBLIOGRAPHY –  
BIBLIOGRAFIA – BIBLIOGRAPHIE -  
BIBLIOGRAFIA**

1. Chopra I.J. - J. Clin. Invest. 54:583, 1974.
2. Chopra I.J., Sack J. and Fischer D.A. - J. Clin. Invest. 55:1137, 1975.
3. Meinhold M., Schurnbrand P. and K.W. Wenzel -Acta Endocrinól. Suppl. 199, 343, 1975.
4. Vagenakis A.G. et al. - J. Clin. Endocrinol. Metab. 41:191, 1975.
5. Janni A. et al. - «The low T3 syndrome» Academic Press, 1980.
6. Janni A. et al. - Atti del IV Simposio Internazionale delle Tecniche Radioisotopiche in vitro, Napoli 1977.
7. Osathanonda R. et al. - J. Clin. Endocrinol. Metab. 46:365, 1978.
8. Rolleri E. - Descrizione parametrica della curva dose-risposta. Giorn. It. Chim. Clin. 2 (1), 1-13-1977.
9. Rolleri E. et al. - Automatic treatment of radioimmunoassay data. The Journal of Nuclear Biology and Medicine. Vol. 17, n. 3, pag. 128-141, 1973.

Physikalisches Daten of <sup>125</sup>I

Physical characteristics of <sup>125</sup>I

Características físicas <sup>125</sup>I

Caractéristiques physique de <sup>125</sup>I

Caratteristica fisica<sup>125</sup>I

t<sub>1/2</sub> = 59.9 days, jours, dias, Tagen, giorni

Wichtigste Emissionen

Main emissions

Emissiones principales

Emissions principales

Emissione principale

	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25